

Systematische Studie der Transfektion von Säugerzellen mittels PDMAEMA-basierter paramagnetischer Nanosterne

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften

(BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Ullrich Stahlschmidt

aus Ravensburg

Bayreuth, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2013 bis März 2018 in Bayreuth am Lehrstuhl Bioprozesstechnik unter Betreuung von Frau Professor Dr. Ruth Freitag angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 04.05.2018

Zulassung durch das Leitungsgremium: 09.05.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 25.01.2019

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Ruth Freitag (Gutachterin)

Prof. Dr. Dirk Schüler (Gutachter)

Prof. Dr. Olaf Stemmann (Vorsitz)

Prof. Dr. Axel Müller

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gentransfer in eukaryotischen Zellen	1
1.2 Transfektion mittels kationischer Polymere	2
1.3 Verwendung von SPIONs.....	7
1.4 Bisherige Arbeiten zu den NP@PDMAEMA Nanosternen.....	9
1.5 Etablierung und Optimierung des Transfektionsprotokolls.....	12
1.6 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2. In vitro Charakterisierung der Nanosterne	17
2.1 Einleitung.....	17
2.2 Ergebnisse und Diskussion	20
2.2.1 Oberflächenladung der Polyplexe als Funktion des N/P-Verhältnisses ..	20
2.2.2 Größe der Polyplexe als Funktion vom N/P-Verhältnis	21
2.2.3 Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Größe von Polyplexen.....	27
2.2.4 Komplex Stabilität.....	32
3. Transfektion mit NP@PDMAEMA Nanosternen	36
3.1 Einleitung.....	36
3.2 Ergebnisse und Diskussion	40
3.2.1 Charakterisierung des Nanosterns NS4	40
3.2.1.1 Auswirkung des Transfektionsprotokolls auf die Größe der Polyplexe	40
3.2.1.2 Untersuchung der Zytotoxizität über die Stoffwechselaktivität	42
3.2.1.3 Vergleich der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität in verschiedenen Zelllinien.....	43

3.2.1.4 Abschließende Betrachtung der Ergebnisse	45
3.2.2 Anpassung des N/P-Verhältnis für die Transfektion	46
3.2.3 Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Magnetismus	50
3.2.3.1 Vergleich der verschiedenen Nanosterne	52
3.2.3.2 Einfluss der Interaktionszeit	56
3.2.3.3 Einfluss der Inkubationsdauer	58
3.2.3.4 Transfektionseffizienz und Magnetismus in verschiedenen Zelllinien	61
3.2.3.5 Magnetische Abtrennung und anschließende Kultivierung.....	64
3.2.4 Korrelationsanalyse	71
4. Untersuchung der NP@PDMAEMA-PDEGMA Nanosterne.....	74
4.1 Einleitung.....	74
4.2 Ergebnisse und Diskussion	75
4.2.1 Größe und Ladung als Funktion des N/P-Verhältnis	75
4.2.2 Transfektionseffizienz und Magnetismus.....	77
4.2.2.1 Korrelation zwischen Magnetismus und Transfektionseffizienz	77
4.2.2.2 Transfektion in Anwesenheit von Serum	80
5. Lokalisierung der Nanopartikel per Transmissions-elektronenmikroskopie	82
5.1 Einleitung.....	82
5.2 Ergebnisse und Diskussion	84
5.2.1 Dokumentation der Nanosterne via Cryo-TEM.....	84
5.2.2 Etablierung des Präparationsprotokolls	86
5.2.3 Lokalisierung der Nanosterne in transfizierten Zellen mittels TEM.....	88

5.2.4 TEM-Aufnahmen transfizierter CHO Zellen in Abhängigkeit von der Interaktionszeit	96
5.2.5 Detektion der Nanosterne über Elektronenenergieverlust-spektroskopie	101
6. Zusammenfassung	103
7. Summary	105
8. Anhang	107
8.1 Zusätzliche Ergebnisse.....	107
8.1.1 Größenbestimmung der Nanosterne über DLS	107
8.1.2 Einfluss des Transfektionsprotokolls	107
8.2 Material & Methoden.....	108
8.2.1 Verwendete Materialien und Geräte	108
8.2.1.1 Chemikalien	108
8.2.1.2 Geräte und Hilfsmittel.....	109
8.2.1.3 Enzyme und Seren.....	110
8.2.1.4 Puffer- und Medienzusammensetzung.....	111
8.2.1.5 Plasmide	112
8.2.1.6 Sonstige Materialien und Verbrauchsgegenstände	114
8.2.2 Verwendete PDMAEMA-basierte Nanosterne.....	114
8.2.3 Charakterisierung der DNA-Polymer Komplexbildung.....	115
8.2.3.1 Messungen im Zetasizer	115
8.2.3.2 ΔT Assay	115
8.2.4 Zellbiologische Methoden.....	116
8.2.4.1 Stammhaltung	116

8.2.4.2 Transfektion von Säugerzellen mit kationischen Polymeren	117
8.2.4.3 Untersuchung des zellulären Magnetismus.....	121
8.2.4.3.1. Separierung mittels Magnetic Rack	121
8.2.4.3.2. Magnetische Abtrennung mittels MACS	122
8.2.4.4 Zytotoxizitätsstudien.....	122
8.2.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen	127
8.2.5.1 Präparation der Säugerzellen für die Elektronenmikroskopie.....	127
8.2.5.1.1. Chemische Fixierung und Vorkontrastierung	127
8.2.5.1.2. Entwässerung und Einbettung in Epon	127
8.2.5.2 Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)....	128
8.2.5.3 Durchführung der Cryo-Transmissionselektronen-mikroskopie (Cryo-TEM)	128
8.3 Statistische Auswertungen	129
8.4 Abbildungsverzeichnis	130
8.5 Tabellenverzeichnis	132
8.6 Literaturverzeichnis.....	132
8.7 Abkürzungsverzeichnis.....	156
8.8 Liste der Publikationen, die auf Ergebnissen dieser Arbeit basieren	157
8.9 Lebenslauf	158
8.10 Danksagung	159
8.11 Erklärung	160

1. Einleitung

1.1 Gentransfer in eukaryotischen Zellen

Der Transfer von genetischem Material wie DNA oder RNA in eukaryotische Zellen hinein wird Transfektion genannt und ist von großer Bedeutung für den Einsatz in der Biotechnologie. Dieser Prozess kann zur Erzeugung genetisch modifizierter Zellen dienen und stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie von Erbkrankheiten dar. Bei einer Transfektion kann zwischen stabil und transient unterschieden werden. Bei der stabilen Transfektion erfolgt der Einbau des Transgens über einen Selektionsmarker dauerhaft ins Genom der Zelle, während bei der transienten Transfektion lediglich das Plasmid für eine limitierte Zeitperiode von der Zelle abgelesen wird.¹ Da Nukleinsäuren alleine nicht die Plasmamembran von eukaryontischen Zellen überwinden können,^{2,3} muss auf verschiedene Vektoren oder technische Methoden zurückgegriffen werden, um das Transgen in die Zelle zu transportieren und dem Proteinbiosynthese-Apparat der Zelle zugänglich zu machen. Physikalische Techniken wie Elektroporation oder Genkanone kommen im Labormaßstab zum Einsatz, erscheinen aber in Hinblick auf zukünftige in vivo Anwendungen ungeeignet,^{4,5} daher liegt das Ziel aktuell in der Entwicklung effizienter synthetischer Vektoren und Genvehikel.⁶ Momentan machen mit ~68 % aller klinischen Studien die viralen Vektoren noch immer den größten Teil im Bereich der Gentherapie aus ("Wiley Gene Therapy Clinicals Trials Worldwide" Datenbank, Stand April 2017),⁷ doch es ist ein zunehmendes Interesse für nicht-virale Vektoren zu beobachten. Viren-basierte Vektoren bieten gegenüber synthetischen Vektoren eine wesentlich höhere Effizienz, aber sind auch potentiell für den Patienten gefährlich, da sie beispielsweise eine Immunantwort stimulieren, über toxische Wirkung verfügen oder in Spezialfällen gar Krebs auslösen können.⁸ Überdies sind sie limitiert bei der Aufnahmekapazität für fremdes genetisches Material.

Synthetische nicht-virale Vektoren hingegen sind einfacher aufgebaut, können in ihrer Struktur vielfältig angepasst und im Großmaßstab hergestellt werden. Die Nachteile, die den Einsatz in der Gentherapie aktuell noch limitieren, sind die vergleichsweise geringe Transfektionseffizienz und meist die fehlende Spezifität für die Zielzellen.⁹ Abgesehen von Calciumphosphat-abhängigen Transfektionsmethoden¹⁰ basieren die meisten synthetischen Vektoren dabei entweder auf kationischen Lipiden oder Polymeren.¹¹

1.2 Transfektion mittels kationischer Polymere

Eine Klasse innerhalb der nicht-viralen Vektoren stellen die kationischen Polymere dar. Diese sind bei physiologischem pH positiv geladen und können so die negativ geladene DNA als Komplex binden und sogenannte Polyplexe bilden. Eines der ersten und bislang am gründlichsten untersuchten kationischen Polymer-basierten Transfektionsagenzien ist Polyethylenimin (PEI),¹² welches bis heute aufgrund der kostengünstigen Herstellung und hohen Effizienz den Goldstandard in diesem Bereich darstellt. Eine Alternative zu PEI bietet die Verwendung von Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat (PDMAEMA).¹³ Letzteres erreicht mittlerweile ähnlich hohe Transfektionseffizienzen wie PEI, ist dabei jedoch weniger zytotoxisch und kann in der Struktur vielfältiger angepasst werden. Es wurden bereits von linearen bis zu vielfältig verzweigten oder sternförmigen viele verschiedene Strukturen untersucht.^{14–16} Verglichen mit ihren linearen Pendants, zeigten nicht-lineare Polymere eine höhere Transfektionseffizienz bei gleichzeitig geringerer Zytotoxizität.^{16,17}

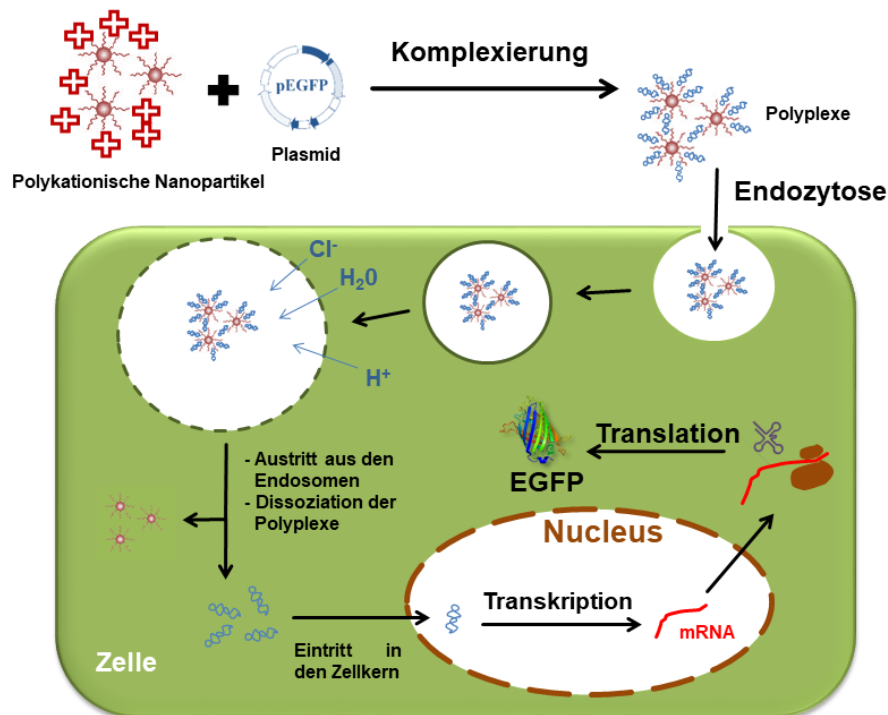


Abbildung 1: Schema des Ablaufs einer Transfektion

Bevor die DNA in die Zelle gelangen kann, muss sie zusammen mit dem Polymer im Komplex verpackt werden. Dies führt zur Kondensation der DNA, wodurch die Aufnahme in die Zelle gefördert wird und die DNA vor enzymatischer Degradation durch intrazelluläre Nukleasen geschützt wird.¹⁸ Im Falle der kationischen Polymere erfolgt die Bindung der DNA an das Polymer durch hydrophobische und elektrostatische Interaktionen zwischen den anionischen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats und den kationischen Gruppen (üblicherweise Aminogruppen) des polymerischen Transfektionsagens.¹⁹ Der Schritt der Polyplex-Bildung kann bereits maßgebend für das Gelingen einer Transfektion sein. Daher sind die Bedingungen, unter welchen die Komplexbildung zwischen DNA und Polykation stattfindet, entscheidend. Die Ladung des Polykations ist vom pH-Wert des Mediums abhängig und beeinflusst beispielsweise die Stabilität der Polyplexe. So führt ein Absenken des pH-Werts zu einer zusätzlichen Protonierung der Aminogruppen des

Polykations, wodurch mehr Ladungen für die Komplexbildung zur Verfügung stehen.^{20,21} Hohe Salzkonzentrationen dagegen verringern die kolloidale Stabilität und begünstigen die Bildung von Aggregationen.^{22,23} In Anwesenheit von Serumproteinen können diese an der Oberfläche der geladenen Polymere aggregieren und eine Polymerkorona bilden, die sich im Aufbau je nach Außenladung unterscheidet und den Aufnahmeweg beeinflussen kann.²⁴ Auch der Aufbau und die Struktur des Polykations beeinflussen die Transfektion in erheblichem Maße: Polymere mit hohem Molekulargewicht und längeren Ketten zeigen stärkere Bindung an die DNA, erhöhte Aufnahme durch die Zellen und Transfektionseffizienz, wohingegen Polymere mit geringem Molekulargewicht und kürzeren Ketten weniger toxisch sind und durch die geringere Polyplexstabilität die spätere Dissoziation des Komplex im Zytoplasma vereinfachen.^{25,26}

Die erste Hürde, welche die Polyplexe überwinden müssen, stellt die Biomembran der Zellen dar. Der Prozess, durch welchen die Zellen extrazelluläre Moleküle aufnehmen, wird als Endozytose bezeichnet. Dabei werden unter Energieverbrauch die Plasmamembran eingefaltet, die Moleküle eingeschlossen und ins Zellinnere transportiert. Dies stellt den Haupttransportweg für die meisten Polyplexe ins Zellinnere dar.^{27–29} Endozytose beinhaltet als Überbegriff ebenfalls Transportwege wie Makropinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose. Zur Phagozytose sind nur spezialisierte Zellen wie Makrophagen oder Monozyten befähigt und daher ist dieser Aufnahmeweg weniger wichtig für die Transfektion.³⁰ Eine verbreitetere Form der Aufnahme stellt die Makropinozytose dar, bei welcher große Vesikel gebildet werden (~ 200 nm bis 5 µm) und auf diese Weise eine Flüssigkeitsmenge und darin gelöste Substanzen aufgenommen werden.³¹ Auch wenn die Makropinozytose bei der Aufnahme von Polyplexen beteiligt ist, geschieht der Großteil der Polyplex-Aufnahme über die Rezeptor-vermittelte, das heißt Clathrin-abhängige, Endozytose oder über die Caveolae-Endozytose. Die Clathrin-abhängige Endozytose stellt bei den meisten Zellen den hauptsächlichen

Aufnahmeweg dar.^{32,33} Bei diesem Prozess wird durch die Bindung des Proteins Clathrin an den Rezeptor die Bildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln gefördert und es kommt in einem komplexen Prozess mit über 50 beteiligten Proteinen zu einer Invagination der Plasmamembran.³⁴ Nach der Abschnürung dieser Vesikel erfolgen der Transport ins Zellinnere über das Zytoskelett und die Fusion mit einem Endosom. Bei den Caveolae handelt es sich um spezielle Lipid Rafts-ähnliche Membranbereiche von etwa 50 nm, die in Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten oder glatten Muskelzellen vorkommen.³⁵ Interessant an diesem Aufnahmeweg ist die Tatsache, dass die Verschmelzung mit einem Lysosom umgangen wird. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass über eine forcierte Aufnahme über den Caveolae-Weg sich die Transfektionseffizienz steigern lässt.³⁶ Eine positive Ladung der Polyplexe erleichtert dabei die Aufnahme in die Zellen über unspezifische Adsorption an die negativ geladenen Proteoglykane auf der Außenseite der Plasmamembran.³⁷

Unabhängig vom Aufnahmeweg werden die Nanopartikel zunächst in endozytische Vesikel eingeschlossen. Das erste Vesikel, auch als frühes Endosom bezeichnet, durchläuft eine Reifung, indem es mit anderen Vesikeln fusioniert, die für die Sortierung von (Zell-)Material zuständig sind, welches gegebenenfalls durch Exozytose wieder aus der Zelle hinausbefördert wird. Der Übergang vom frühen zum späten Endosom ist durch eine schnelle Ansäuerung (pH 5 – 6) gekennzeichnet, welche in der Aktivität von ATPase Protonenpumpen begründet liegt.³⁸ Bei weiterer Reifung des Endosoms fusioniert dieses schließlich mit einem Lysosom, was zu einem weiteren Absenken des pHs (~ pH 4,5) und zur Aktivierung von verschiedenen Verdauungsenzymen führt. Spätestens bei diesem Schritt würde ein Abbau der DNA erfolgen, daher müssen die Polyplexe für eine erfolgreiche Transfektion nach Internalisierung durch die Zelle aus den Endosomen austreten und in das Zytosol gelangen. Die kationischen Polymere können den Austritt durch ihre positive Nettoladung bewirken.³⁹ Dieser Vorgang kann mittels der „proton

sponge“ Hypothese erklärt werden.^{40,41} Endosomen haben einen spezifischen pH-Wert, den die Zelle versucht aufrechtzuerhalten. Wenn jedoch protonierbare Polymere, wie beispielsweise PEI, in die Endosomen eingeschlossen werden, kann dieses pH-Gleichgewicht destabilisiert werden, da durch die Protonierung der Aminogruppen der Protoneneinstrom abgepuffert wird. Die Membranengebundenen ATPase-Ionenkanäle der Endosomen pumpen als Folge weitere Protonen in das Endosom, was zum Aufbau eines Ladungsgradienten und zum passiven Einstrom von Cl⁻-Ionen führt. Dies resultiert schließlich im Einstrom von Wasser aus dem Zytosol und dem Anschwellen der Endosomen, bis sie platzen.^{42,43} Polymere mit einer höheren Pufferkapazität zeigen meist auch eine höhere Transfektionseffizienz. Auch wenn es Autoren gibt, die dieser Hypothese widersprechen^{44–46} oder alternative Mechanismen vorschlagen,⁴⁷ wird die „proton sponge“ Hypothese aktuell von einem Großteil der Arbeitsgruppen zitiert, um den Vorgang des Austritts der Polyplexe aus den Endosomen zu erklären.

Es wird davon ausgegangen, dass im nächsten Schritt die Dissoziation des pDNA-Polymer Komplexes erfolgen muss, damit der Eintritt der DNA in den Zellkern erfolgen kann und diese nicht von Nukleasen des Zytoplasmas abgebaut wird.⁴⁸ Die Freisetzung der DNA aus dem Komplex ist eine der Barrieren einer effizienten Transfektion.⁴⁹ Kürzere Polykationen zeigen eine geringere Zytotoxizität und haben eine höhere Wahrscheinlichkeit von der DNA zu dissoziieren, der Nachteil besteht allerdings in der geringeren Stabilität in Anwesenheit von Serum und Salzlösungen. Die Kettenlänge und das Molekulargewicht des Polymers spielen eine essentielle Rolle bei der DNA Freisetzung und der optimale Wert ist je nach Polymer verschieden.⁵⁰ Je größer die Moleküle, desto langsamer ist auch die zytoplasmatische Mobilität und je länger die DNA im Zytoplasma verweilt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Degradation durch zytoplasmatische Nukleasen.^{47,51} Untersuchungen haben gezeigt, dass die Halbwertszeit von nackter Plasmid-DNA („pDNA“) im Zytoplasma 50 – 90 min beträgt.⁵²

Der Zellkern enthält das Genom der Zelle und stellt damit das Kontrollzentrum dar. Damit die genetische Information des Transgens in ein Protein übersetzt werden kann, muss der Import der DNA in den Zellkern erfolgen. Der Zellkern wird durch die Kernhülle vom Zytoplasma abgegrenzt, eine weitere Hürde, die bei einer Transfektion überwunden werden muss. Kleinere Partikel ($< 10\text{ nm}$ und $< 40\text{ kDa}$) können frei durch die in die Kernhülle integrierten Kernporen hinein und hinaus diffundieren, während größere Partikel über Kernlokalisierungssequenzen (NLS, *engl. nuclear localization signal*) in den Zellkern importiert werden.^{53,54} Dabei handelt es sich um spezifische Abfolgen von wenigen Aminosäuren, die Proteine tragen, welche in den Zellkern eingeschleust werden sollen.

In der Regel sind sich teilende Zellen einfacher zu transfizieren, da durch die Auflösung der Kernhülle während der Mitose diese Barriere zeitweise aufgehoben wird.⁵⁵ Bislang nur wenig bekannt über die beteiligten intrazellulären Mechanismen. Dabei kommt noch erschwerend hinzu, dass die intrazellulären Vorgänge je nach verwendetem Zelltyp oder Aufbau des Polymers voneinander abweichen können.²⁷

1.3 Verwendung von SPIONs

Neben der Transfektion mittels linearer oder verzweigter Polymere, können diese auch genutzt werden, um solide Nanopartikel zu funktionalisieren und damit neue Eigenschaften zu ermöglichen, beispielsweise im Falle von Eisenoxid-basierten Nanomaterialien mit zusätzlichen magnetischen Eigenschaften. Die beiden gebräuchlichsten Formen bestehen aus Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). In den letzten 20 Jahren sind dabei besonders die superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel (*engl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs*) in den Fokus der Wissenschaft gerückt.^{56,57} Die magnetischen Eigenschaften dieser Partikel kann man sich zu Nutze machen, indem beispielsweise magnetische Felder für eine verbesserte Transfektion genutzt werden („Magnetofektion“).⁵⁸ Für diese

Prozedur wird ein Komplex aus einem Nukleinsäuren-Vektor und üblicherweise Eisenoxid-basierten Nanopartikeln gebildet und zu den Zellen gegeben. In den darauf folgenden Schritten wird ein magnetischen Feld unterhalb der Zellkulturschale angelegt, um den magnetischen Transfektionskomplex schließlich auf die Zellen zu lenken.⁵⁹ Es wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Magnetofektion die Transfektionseffizienz erhöhen, dosisabhängige Effekte verbessern und den Aufnahmeprozess beschleunigen kann.⁶⁰

Für medizinische Bedürfnisse stellen der zielgerichtete Transport und die Aufkonzentrierung von Eisenoxid-Nanopartikeln in einem spezifischen Zielbereich, wie beispielsweise einem Gewebe oder einem Tumor, vielversprechende Anwendungen dar.^{61,62} Die Vorteile der Verwendung von magnetisch-gerichteter Wirkstoff-Verabreichung liegen bei der nicht-invasiven Wirkstoff-Anreicherung am Zielort mit der Möglichkeit dabei gleichzeitig die Dosen von toxischen Verbindungen präziser zu dosieren, die Wirkstoff-Komplexe über Magnetresonanztomographie (engl. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) zu lokalisieren, der magnetisch induzierten Wirkstoff-Freisetzung oder in der Limitierung der Verteilung bei systemischer Verabreichung.⁶³ Bei der magnetischen Hyperthermie-Therapie wird ein alternierendes magnetisches Feld genutzt, um lokal Hitze zu erzeugen, was genutzt werden kann, um einen lokal begrenzten Tumor zu bekämpfen.⁶⁴ In den letzten Jahren wurden daher eine Vielzahl von Arbeiten über die Verwendung von magnetischen Nanopartikeln durchgeführt, sowohl in vitro als auch in vivo, von Tiermodellen bis zu klinischen Studien am Menschen.^{65–67} Nichtsdestotrotz ist dieses Forschungsfeld vergleichsweise neu, viele Mechanismen sind noch nicht grundlegend verstanden und die klinische Anwendung bleibt derzeit noch schwierig.

1.4 Bisherige Arbeiten zu den NP@PDMAEMA Nanosternen

Schallon et. al (2010) konnten zeigen, dass ein sternförmiger PDMAEMA Vektor gegenüber der linearen Form über eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz verfügte¹⁶. Die Transfektionseffizienz in adhärenenten Zellen war vergleichbar mit PEI, in sich nicht mehr teilenden Zellen dagegen deutlich überlegen. Darüber hinaus führte die sternförmige Struktur des PDMAEMA-Polymers zu einer erheblichen Verringerung der Zytotoxizität. In Synatschke et. al (2011) wurde anhand einer Bibliothek linearer und sternförmiger PDMAEMA-Homopolymere der Einfluss der Polymerarchitektur und des Molekulargewichts auf die Transfektionseffizienz und Zellviabilität dargestellt.⁶⁸ Es wurde beobachtet, dass eine Zunahme der Armzahl zu einer Verringerung der Toxizität führte, es war dabei ein Molekulargewicht oberhalb von 20 kDa für eine erfolgreiche Transfektion nötig.

Die Weiterentwicklung dieser sternförmigen PDMAEMA-Polymere stellen Nanopartikel mit festem $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Kern dar, welcher über *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP)⁶⁹ mit PDMAEMA bestückt wurde. Diese "Nanosterne" wurden von Dr. Alexander P. Majewski (Lehrstuhl Makromolekulare Chemie II, Uni Bayreuth) synthetisiert und strukturell mit verschiedenen Methoden charakterisiert, nachzulesen in Majewski et al. (2012).⁷⁰ Die zweite Generation dieser Nanosterne besteht aus einem Maghemit-Kern ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), der über eine Silica-Hülle mit einem ATRP-Initiator (2-Bromisobutyryl-6-(trichlorosilyl)hexanoat, BIBSI) funktionalisiert wurde. Die Silica-Beschichtung erhöht die Biokompatibilität⁷¹ und ermöglicht die kovalente Verknüpfung der Polymer-Korona mit dem Kern. Dies erhöht die Stabilität und soll eine Ablösung der Polymerketten über die Zeit unterbinden. Werden die Eisen-Nanopartikel dagegen nur physikalisch ohne „cross-linking“ mit den Polymeren verknüpft, kann über die Zeit eine Ablösung von diesen erfolgen.^{72,73} Die Nanosterne der ersten Generation besaßen diese Silica Hülle noch nicht.

Ausgehend von den Initiatoren auf der Silica Hülle wurde die DMAEMA Polymerisation gestartet („*grafting from approach*“),⁷⁴ so dass schließlich

sternförmige Vektoren mit kovalent verknüpften PDMAEMA-Armen erhalten wurden, die Nukleinsäuren komplexieren können. Darüber hinaus wurden noch zwei Varianten hergestellt, an deren PDMAEMA Arme jeweils noch ein äußerer PDEGMA Block hinzu synthetisiert wurde. Ein Schema des Aufbaus der Nanosterne ist Abbildung 2 gezeigt.

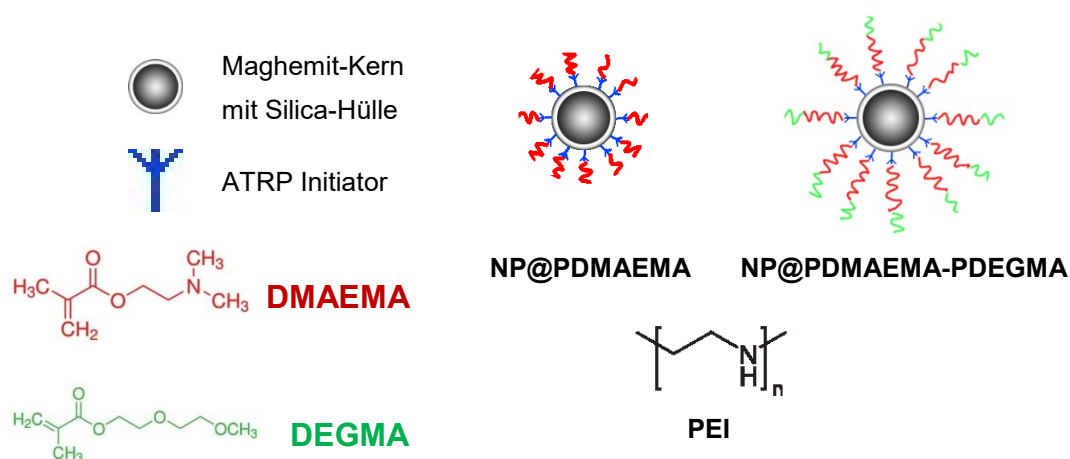


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der verwendeten Nanosterne und kationischen Polymere

DMAEMA: 2-(dimethylamino)ethylmethacrylat

DEGMA: Di(ethylenglycol)methylethermethacrylat

PEI: Polyethylenimin

Von diesen Nanopartikel wurden verschiedene Varianten hergestellt, die sich hauptsächlich in der Länge sowie Anzahl der PDMAEMA-Arme unterscheiden. Als Beispiel lautet die Formel für die Zusammensetzung des Nanopartikels „NS4“ bei einem Silica-umhüllten Maghemit-Kern mit 91 Armen, die aus einem Polymer von 540 DMAEMA-Einheiten bestehen, dann $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Silica} @(\text{PDMAEMA}_{540})_{91}$. Eine Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymere ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Aufbau und Zusammensetzung der Nanosterne

Bezeichnung	Anzahl Arme	Armlänge PDMAEMA block	Kern Durchmesser (nm)	Grafting density (Ketten/nm ²)	Mn (kg/mol)	PDI
NS1	5	300	16,5	0,006	235	1,2
NS2	9	242	15,4	0,011	342	1,2
NS3	20	528	15,4	0,024	1660	1,3
NS4	91	540	28,8	0,035	7735	1,38
NS5	46	1037	15,4	0,054	7498	1,6
NS6	54	1470	15,4	0,064	12470	1,4
NS7	85	1400	16,5	0,100	18700	1,6
NS8	337	312	26,8	0,149	16513	1,4
NS9	411	477	26,8	0,182	30825	1,5
NS10	653	1240	26,8	0,289	127335	1,5
NS11	657	439	26,8	0,291	45333	1,4
NS12	679	1616	26,8	0,300	172466	1,3

Die Nanosterne wurden für die bessere Übersichtlichkeit basierend auf der grafting density in drei Gruppen eingeteilt und aufsteigend sortiert.

PDMAEMA: Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat).

PDEGMA: Poly(di(ethylenglycol)) methylethermethacrylat.

PDI: Polydispersitätsindex (Mw/Mn).

Die Vorteile der Polymerisierung via ATRP liegen in der Kontrolle über die Molekülmasse, einer engen Verteilung der molaren Masse sowie dem Potential der Herstellung von komplexen molekularen Polymerstrukturen.^{75–78} Eine Alternative hierzu stellt die Polymerisierung via RAFT (engl. *Reversible Addition Fragmentation Transfer*) dar.⁷⁹

Der Grund für die magnetischen Eigenschaften der Nanosterne liegt in den Maghemit-Kernen begründet. Unterhalb des „cloud points“ verhindern Abstoßungskräfte durch die stark positive Polymerkorona die Zusammenlagerung. Werden die positiv geladenen Nanopartikel jedoch beispielsweise mit negativ geladenen DNA-Molekülen inkubiert, bilden sich Komplexe, die magnetisch abgetrennt werden können.^{70,80}

1.5 Etablierung und Optimierung des Transfektionsprotokolls

Die zweite Generation dieser Nanopartikel wurde im Rahmen der Masterarbeit auf ihre Eignung als Genvehikel untersucht.⁸¹ Übereinstimmend mit anderen nichtviralen Transfektionsagenczien zeigte sich, dass die Transfektion in adhärenenten Zellen wesentlich besser funktioniert als in Suspensionszellen. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten das N/P-Verhältnis (also das Molverhältnis der Amingruppen von kationischen Polymeren zu dem der Phosphatgruppen von Nukleinsäuren) als einer der wichtigsten Einflussfaktoren von Transfektionseffizienz und Zytotoxizität.^{16,82} Üblicherweise korreliert dabei zunächst die Zahl der positiv transfizierten Zellen mit dem N/P-Verhältnis bis das Maximum erreicht ist. Die weitere Erhöhung des N/P-Verhältnis bewirkt dann eine Zunahme der Zytotoxizität bis dann schließlich auch die Transfektionseffizienz wieder abnimmt.⁸²

Das Standard Transfektionsprotokoll dieser Arbeit wurde von dem adaptiert, welches für die erste Generation der Nanosterne⁷⁰ verwendet wurde. Der allgemeine Ablauf des adaptierten Protokolls verläuft wie folgt (Abbildung 3):

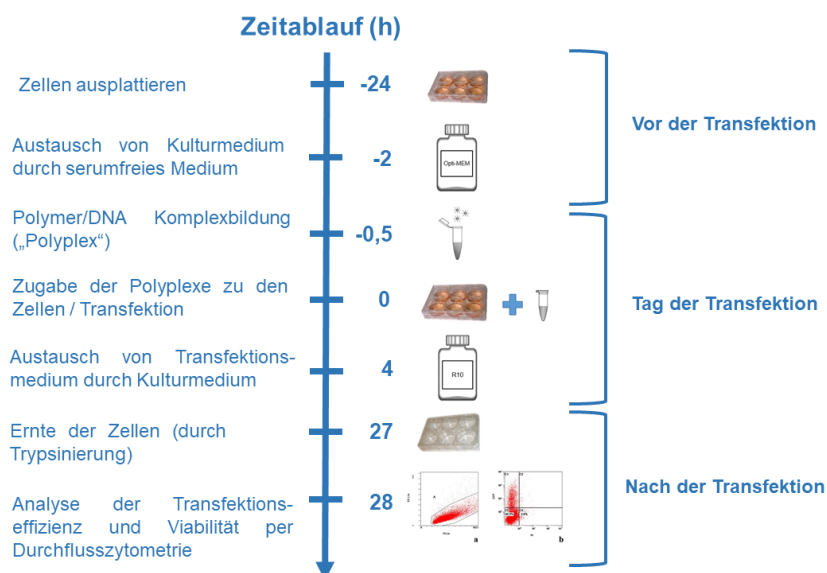


Abbildung 3: Schema des Ablaufs der Transfektion nach dem adaptierten Transfektionsprotokoll

Am Vortag der Transfektion werden die Zellen in Kulturmedium in 6-well Platten ausplattiert und unter den Bedingungen der Stammhaltung inkubiert. Am nächsten Tag wird das Kulturmedium durch serumfreies Transfektionsmedium ("Opti-MEM" Medium) ausgetauscht und die Zellen für 2h im Inkubator inkubiert, damit sich der pH-Wert und die Temperatur des Mediums an die Bedingungen im Inkubator equilibrieren können. In der Zwischenzeit werden die Polyplexe vorbereitet: Hierfür wird die pDNA in NaCl-Lösung vorgelegt, mit Transfektionsmedium versetzt und anschließend je nach gewünschtem N/P-Verhältnis die entsprechende Menge an kationischem Polymer zugegeben und gemixt. Dies stellt den Transfektionsmix dar, welcher im Anschluss für 30 min bei Raumtemperatur für die Polyplexbildung inkubiert wird. Anschließend wird der Transfektionsmix zu den Zellen gegeben und die Platte mit den Zellen für weitere 4h in den Inkubator überführt. Schließlich wird das Transfektionsmedium mit den freien Polyplexen durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 22 h inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, damit die Zelle in der Zwischenzeit das Transgen des Plasmids exprimieren und das Genprodukt (= das EGFP-Protein) synthetisieren kann. Am nächsten Tag erfolgt die Ernte der Zellen, im Falle von adhärenenten Zellen durch einen zusätzlichen Trypsinierungsschritt zum Ablösen der Zellen, und die Analyse der Transfektionseffizienz sowie der Viabilität im Durchflusszytometer.

Bei der Adaption des Transfektionsprotokolls zeigte sich, dass die Art der Polyplex Bildung erheblichen Einfluss auf den Transfektionserfolg hat. Wurden die Polyplexe direkt in 1 ml Opti-MEM, dem Transfektionsmedium, gebildet statt in 200 µl NaCl-Lösung (150 mM), so führte dies sowohl zu einer höheren Zahl an transfizierten Zellen, als auch zu einer Verringerung der Zytotoxizität. Da die Interaktion der pDNA mit dem Polykation hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen geschieht, spielen Faktoren wie die ionische Stärke und damit auch der pH-Wert eine entscheidende Rolle bei der Polyplex-Bildung. Die Bedingungen der Komplexbildung wie beispielsweise der Zusammensetzung des

Komplexierungsmediums, des Reaktionsvolumens oder der Inkubationstemperatur können den Ausgang einer Transfektion maßgeblich mitbeeinflussen.^{44,83,84} So kann eine positive Nettoladung die unspezifische Aufnahme in die Zelle fördern über elektrostatische Interaktionen mit der negativ geladenen Außenseite der Zellmembran.^{85,86} Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass pro einzelner Polymerkette wenigstens 6 bis 8 Ladungen vorhanden sein müssen für eine effektive Nukleinsäurenkondensation und damit effiziente Transfektion.^{49,87,88} Die geringere Ladungsdichte von PDMAEMA verglichen mit PEI könnte die Dissoziation der Polyplexe im Zytosol vereinfachen, was die hohen Transfektionseffizienzen von manchen PDMAEMA-basierten Transfektionsagenzien erklären würde.⁸⁹

1.6 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Es wurde bereits gezeigt, dass sich mit den NP@PDMAEMA Sterne der ersten Generation eukaryotische Zellen erfolgreich transfizieren lassen.^{70,80} Im Fokus dieser Arbeit stehen die weitere in vitro Charakterisierung der Silica-umhüllten Nanosterne und die Untersuchung der Mechanismen im Rahmen der Transfektion. Zu diesem Zweck wurde eine Bibliothek dieser Nanosterne von Dr. Alexander P. Majewski synthetisiert, bei der sich die einzelnen Vertreter im Wesentlichen in der Armlänge (also der Zahl an DMAEMA Monomeren) und Armzahl unterscheiden. Dies ermöglicht eine tiefergehende Charakterisierung des Einflusses von Struktur und Zusammensetzung auf die Funktion der Nanosterne und könnte Ansatzpunkte für die weitere strukturelle Optimierung der Nanosterne für eine verbesserte Transfektionsleistung bieten. Die Nanosterne wurden daher zunächst physikochemisch mit verschiedenen Methoden charakterisiert. Größe und Ladung der Polyplexe sind wichtige Einflussgrößen für die Transfektion.^{90–92} Mit einem Zetasizer wurde über Messung des Zetapotentials die Ladung der Nanosterne und der zugehörigen Polyplexe bestimmt. Darüber hinaus wurden noch die Größen der Polyplexe unter verschiedenen Bedingungen mittels DLS-Messung (Dynamische

Lichtstreuung) bestimmt. Eine weitere wichtige Einflussgröße für die Transfektion stellt die Stabilität des DNA-Polymerkomplexes dar. Die DNA muss im Komplex stark genug kondensiert werden, um vor dem intrazellulären sauren Milieu und dem Angriff durch Nukleasen geschützt zu sein.⁹³ Die Interaktion darf jedoch nicht zu stark sein, da es sonst nicht zur Freisetzung der DNA aus dem Komplex in das Zytoplasma kommt und damit die Transfektion beeinträchtigt wird.⁹⁴ Zur Untersuchung der Komplexstabilität wurde ein Assay verwendet, der über die Messung der DNA-Schmelztemperatur einen Rückschluss auf die Komplexstabilität zulässt.

Im nächsten Teil der Arbeit wurden die verschiedenen Varianten der Nanosterne genutzt, um die Transfektion in unterschiedlichen Zelllinien zu untersuchen. Im zentralen Fokus lag dabei die Ermittlung der Transfektionseffizienz, der Viabilität und des Anteils an magnetischen Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde bestimmt über die Expression des EGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*) Transgens, welches für ein grün fluoreszierendes Protein kodiert^{95,96} und somit als Marker für eine erfolgreiche Transfektion diente. Das N/P-Verhältnis gilt als eines der wichtigsten Einflussgrößen einer Transfektion und wird üblicherweise als einer der ersten Ansatzpunkte angepasst, wenn das Transfektionsprotokoll optimiert werden soll. Dieses Vorgehen wurde in verschiedenen Zelllinien experimentell geprüft und der Einfluss des N/P-Verhältnisses auf den Ausgang der Transfektion mit statistischen Methoden untersucht. Bei der Verwendung von nicht-viralen Transfektionsagenzien spielt die Zytotoxizität eine wichtige Rolle. Daher wurde über zwei verschiedene Farbstoff-basierte Tests die Toxizität der Nanosterne untersucht. Der paramagnetische Eisenkern der Nanopartikel bietet die Möglichkeit, die Zellen mit internalisierten Nanopartikel magnetisch abzutrennen. Es wurde dabei untersucht, wie sich der zelluläre Magnetismus bei der Verwendung von unterschiedlichen Zelllinien und Nanosternen verhält und wie der Magnetismus mit der Transfektionseffizienz und der Viabilität korreliert. Schließlich wurde noch eine

umfangreiche Statistik-Untersuchung durchgeführt, um statistische Korrelationen der Attribute der physikochemischen Charakterisierung wie beispielsweise der Polypexgröße oder -Ladung mit den zellulären der Transfektion wie beispielsweise der Transfektionseffizienz und der Viabilität aufzudecken.

Im dritten Teil der Arbeit wurden zwei neue modifizierte Vertreter der Nanosterne untersucht. Zur Erhöhung der Blut-Kompatibilität und im Hinblick auf potentielle zukünftige in vivo Anwendungen wurden an die PDMAEMA-Arme jeweils äußere PDEGMA-Blöcke (Poly(di(ethylenglycol))methylethermethacrylat) hinzu synthetisiert. Diese wurden physikochemisch analog zur Charakterisierung der unmodifizierten Nanosterne untersucht. Darüber hinaus wurde das Transfektionsergebnis in Säugerzellen mit den unmodifizierten Nanosternen verglichen, auch in Anwesenheit von Serum.

Während es über die Mechanismen der Aufnahme von Nanopartikeln durch die Zellen zahlreiche Studien gibt, ist über die intrazellulären Prozesse dagegen noch wenig bekannt, insbesondere nach Austritt aus den Endosomen.^{12,97} Der elektronendichte Eisenkern der Nanosterne ermöglicht das Sichtbarmachen im Transmissionselektronenmikroskop. So kann eine Lokalisierung der Nanopartikel ohne zusätzliche Modifikation der chemischen Struktur, wie der Hinzufügung eines Fluoreszenzfarbstoffs, erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit den Nanopartikeln transfiziert und die Nanosterne innerhalb der Zelle lokalisiert. Dies soll einen besseren Einblick in die Vorgänge während einer Transfektion ermöglichen und die intrazelluläre Verteilung der Nanosterne dokumentieren.

2. In vitro Charakterisierung der Nanosterne

2.1 Einleitung

Die Komplexbildung zwischen der DNA und dem Polymer hat großen Einfluss auf die nachfolgende Transfektion. Faktoren wie Größe und Ladung der Polyplexe können signifikante Auswirkungen auf die Aufnahme durch die Zelle haben, beispielsweise durch Beeinflussung des Aufnahmewegs, der Verweildauer im Medium oder der Effizienz der Internalisierung.^{98–100} Eine Methode um die Oberflächenladung zu bestimmen, stellt das Zetapotential dar. Dieses steht für das elektrokinetische Potential in Kolloidsystemen und bezeichnet das elektrische Potential, welches auf der Scherebene wirkt, der äußersten Schicht eines geladenen Partikels in Lösung. Damit kann es als eine relative Messgröße für das Oberflächenpotential und somit der Ladung des Partikels dienen. Es wird über die Messung der elektrophoretischen Mobilität beim Anlegen von Spannung über die Elektroden der Messzelle im Zetasizer ermittelt. Die Bestimmung erfolgt über eine Geschwindigkeitsanalyse auf Basis des Laser-Doppler-Effektes. Die Ladung der Polyplexe gibt einen Hinweis auf das Komplexierungsverhalten der Nanopartikel mit der Plasmid-DNA und beeinflusst zusammen mit den hydrodynamischen Radien der Nanopartikel-pDNA-Komplexe die Aufnahme durch die Zelle und Freisetzung der pDNA im Zytoplasma.¹³

Eine weitere wichtige Messgröße für die Charakterisierung stellt die Größe der Polyplexe dar. Eine Standardmethode für die Untersuchung der Größe und Größenverteilung von Molekülen und Partikeln stellt die dynamische Lichtstreuung (DLS) dar. Bei dieser Technik wird eine Suspension oder Lösung von Partikeln mit einer monochromatischen polarisierten Lichtquelle, für gewöhnlich ein Laser, bestrahlt. Trifft der Lichtstrahl auf die Partikel der Messprobe, wird dessen Richtung und Intensität verändert. Wird dieses Streulicht detektiert und zeitaufgelöst

analysiert, lassen sich Schwankungen der Intensität bestimmen, welche durch die Brownsche Molekularbewegung der Partikel zustande kommen.⁹² Die Geschwindigkeit dieser ungerichteten Bewegung korreliert mit der Größe der Partikel und kann dazu verwendet werden, um über die Autokorrelation des Messsignals die verschiedenen dynamischen Kenngrößen der Partikel zu bestimmen.¹⁰¹ Als Wert für die Berechnung der hydrodynamischen Radien wurden die mittleren intensitätsgewichteten Partikeldurchmesser, "Z-Average" genannt, verwendet. Dieser Parameter gilt als stabile Messgröße, die unempfindlich gegen Messrauschen ist und wird daher als bevorzugter DLS Größenparameter angesehen wird.¹⁰²

Die Polyplexe müssen den Transport aus den Endosomen und den Weg durch das Zytoplasma überstehen und schließlich die pDNA in Nähe des Zellkerns freisetzen. Die intrazelluläre Komplexstabilität zwischen Transfektionsagenz und Transgen stellt einen wichtigen Faktor bei einer Transfektion dar. Sind die Komplexe zu stabil, kommt es womöglich zu einer unzureichenden Freisetzung von pDNA, wohingegen eine zu schwachen Komplexbindung zu einer frühzeitigen pDNA Freisetzung führen kann.¹⁰³

Im nativen Zustand wird der DNA-Doppelstrang über Wasserstoffbrücken der gegenüberliegenden Basenpaare und Stapelwechselwirkungen zwischen aufeinanderfolgenden Basen stabilisiert. Mit Erhöhung der Temperatur werden diese Wasserstoffbrücken aufgebrochen und es kommt schließlich zur Trennung der beiden DNA-Einzelstränge. Die dafür notwendige Temperatur wird als Schmelztemperatur bezeichnet und ist von der Zahl an Wasserstoffbrücken im DNA-Doppelstrang abhängig. Eine Methode, um die Schmelztemperatur zu bestimmen, stellt die Verwendung von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise SYBR-Green oder Ethidiumbromid dar.^{104,105} Durch Bindung an den DNA-Doppelstrang wird die Fluoreszenz verstärkt. Werden die beiden DNA-

Einzelstränge aufgetrennt, führt dies zu einer Freisetzung des Farbstoffs und folglich zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals. Wird das Fluoreszenzsignal gegen die Temperatur graphisch aufgetragen, so zeigt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, bei welchem der Wendepunkt der Kurve die Schmelztemperatur (T_M) darstellt.

Der ΔT -Assay, erstmals vorgestellt in Schallon et al., (2011),¹⁰⁶ basiert auf der Beobachtung, dass durch die Bindung des Polykations an das DNA-Rückgrat es zu einer Verringerung der DNA-Schmelztemperatur kommt. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Hypothese, dass es durch die elektrostatischen Interaktionen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und den positiv geladenen Aminogruppen des Polykations zu einer Stabilisierung des DNA-Einzelstrangs kommt und die Doppelstrang-Hybridstruktur dadurch energetisch weniger günstiger wird.¹⁰⁶ Niedrigere T_M -Werte weisen folglich auf stärkere Polyelektrolyt-Interaktionen hin und als Konsequenz auf eine höhere Polyplex Stabilität. Der ΔT -Assay kann daher als indirekte Messmethode dienen, um die Polyplexstabilität zu beschreiben.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 Oberflächenladung der Polyplexe als Funktion des N/P-Verhältnisses

Als ein Maß für die Oberflächenladung kann das Zetapotential dienen. Um dieses zu bestimmen wurden jeweils Polyplexe aus dem Plasmid pEGFP-N1 und den verschiedenen Nanosternen gemäß den Bedingungen des Transfektionsprotokolls (Kapitel 1.5) gebildet und im Zetasizer das Zetapotential bestimmt. Für die bessere Übersichtlichkeit wurden die Nanosterne basierend auf ihrer Grafting Density in drei Gruppen eingeteilt (Abbildung 4).

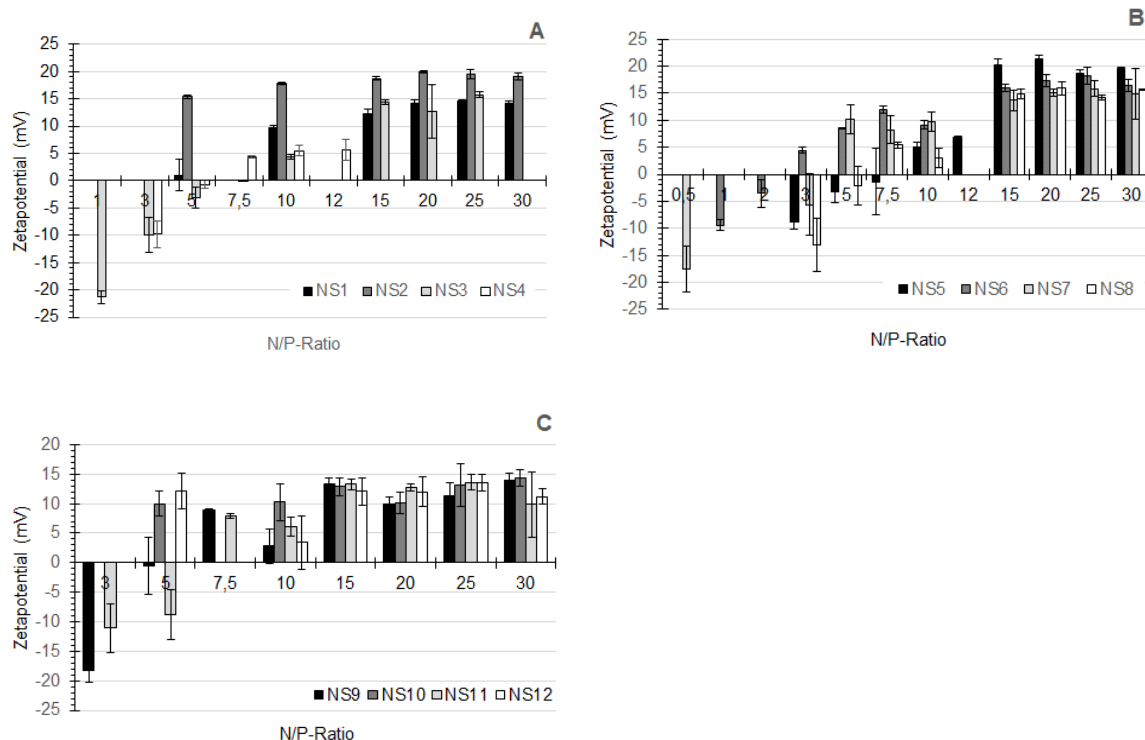


Abbildung 4: Bestimmung des Zetapotentials von Polyplexen in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis

Es wurden Polyplexe zwischen den Nanosternen und dem Plasmid pEGFP-N1 unter den Bedingungen des Transfektionsprotokolls bei verschiedenen N/P-Verhältnissen gebildet. Das Zetapotential wurde mittels Zetasizer gemessen. Verwendet wurden die Nanosterne NS1 – NS4 (A), NS5 – NS8 (B), NS9 – NS10 (C). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 2$. Freie Plasmid-DNA (1 μ g/ml) zeigte ein Zetapotential von $-12,2 \pm 1,3$ mV.

Dabei zeigte sich für alle Nanosterne bei den gebildeten Polyplexen eine Zunahme der Oberflächenladung in Korrelation mit dem N/P Verhältnis. Der Umkehrpunkt von der negativen zur positiven Ladung variierte stark zwischen den verschiedenen Nanosternen. Beispielsweise war der Nanostern NS6 bereits bei einem N/P-Verhältnis von 3 positiv geladen, während die Polyplexe von NS3, NS5 und NS12 erst ab $N/P = 10$ positiv geladen waren. Ein Teil der Nanosterne zeigte bereits beim geringsten untersuchten N/P-Verhältnis eine positive Ladung (NS1, NS2, NS10, NS12). Bei der maximalen Oberflächenladung wurden keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Nanosternen beobachtet, eine Stabilisierung der Oberflächenladung stellte sich im Bereich von 15 bis 22 mV ab einem N/P-Verhältnis ≥ 15 ein. Diese Daten entsprechen anderen PDMAEMA-basierten Transfektionsagenzien, bei welchen die Zetapotentiale ab einem bestimmten N/P-Verhältnis ein Plateau erreichten.^{107,108} Der Grund liegt hierbei vermutlich im Erreichen der Sättigung der Polykationen bei der Komplexierung mit DNA.

2.2.2 Größe der Polyplexe als Funktion vom N/P-Verhältnis

Die Größe der Polyplexe ist entscheidend für die Transfektion, ob in vitro für die Aufnahme in die Zelle oder in vivo für die Pharmakokinetik der Nanopartikel.^{25,109,110} Einer der Parameter, der die Beeinflussung der Größe der gebildeten Polyplexe erlaubt, stellt das N/P-Verhältnis dar.^{22,111} Um die Größe der gebildeten Komplexe in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis zu untersuchen, wurden Polyplexe über einen breiten N/P-Bereich hinweg gebildet und nach 30 min Inkubationszeit im Zetasizer auf ihre Größe hin per DLS analysiert. Die Bedingungen der Polyplexbildung entsprachen dabei den Inkubationsbedingungen für eine Transfektion (Vergleiche hierzu Kapitel 1.5). Die hydrodynamischen Radien der gebildeten Polyplexe sind in Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7 aufgeführt, die für die reinen Nanosterne ohne pDNA-Zugabe sind im Anhang zu finden (Tabelle 6).

In vitro Charakterisierung der Nanosterne

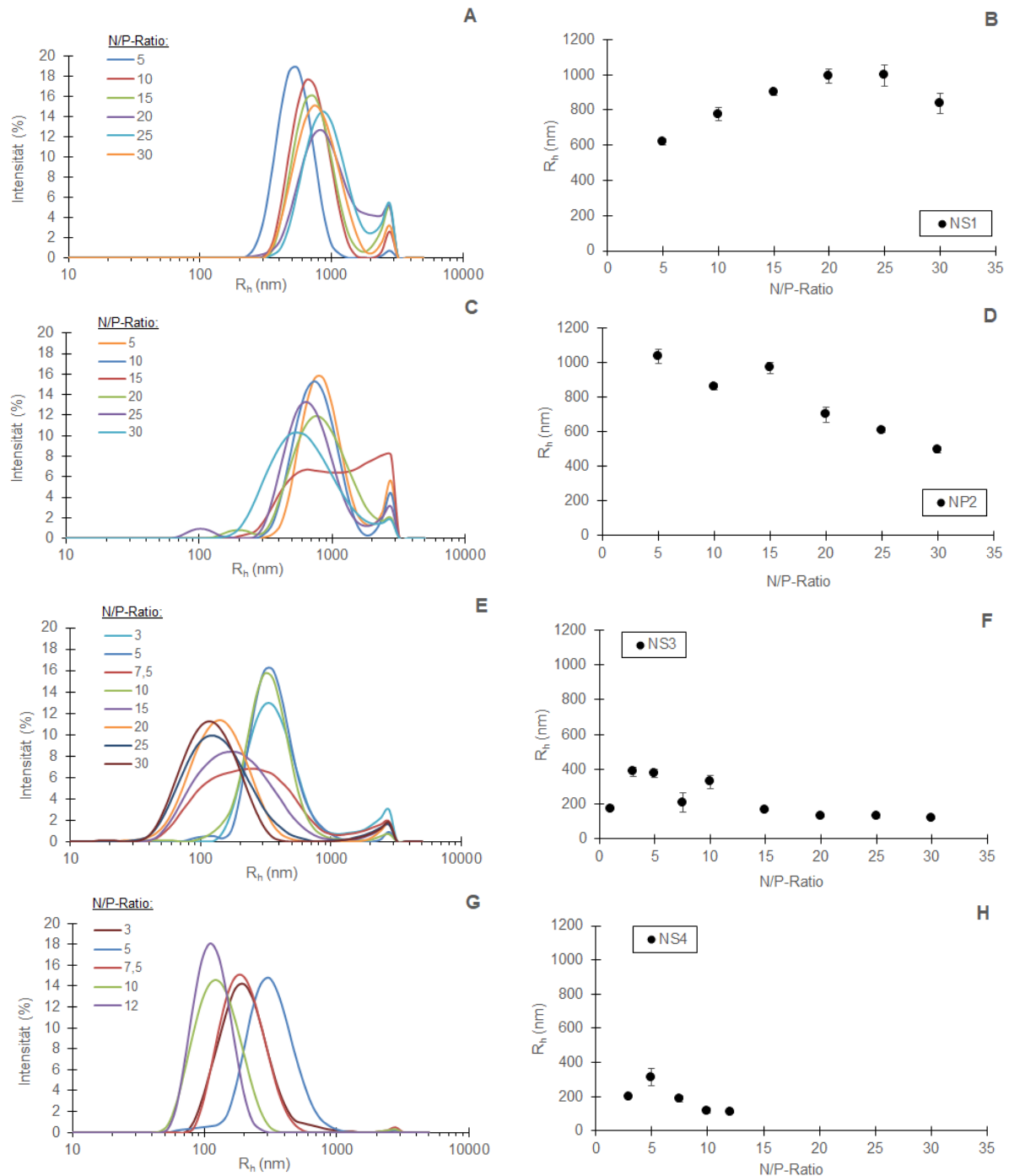


Abbildung 5: Größenbestimmung von Polyplexen der Nanosterne NS1 – NS4

Es wurden Polyplexe zwischen den Nanosternen und dem Plasmid pEGFP-N1 unter den Bedingungen des Transfektionsprotokolls (siehe Kapitel 1.5) bei verschiedenen N/P-Verhältnissen in serumfreiem Kulturmedium (Opti-MEM) gebildet. Die Partikelgrößen wurden im Zetasizer per DLS gemessen. Gezeigt sind die intensitätsgewichteten Verteilungen (A, C, E, G) sowie gemittelten hydrodynamischen Radien in Abhängigkeit von der N/P-Ratio (B, D, F, H). Verwendet wurden die Nanosterne NS1 (A, B), NS2 (C, D), NS3 (E, F) und NS4 (G, H). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$.

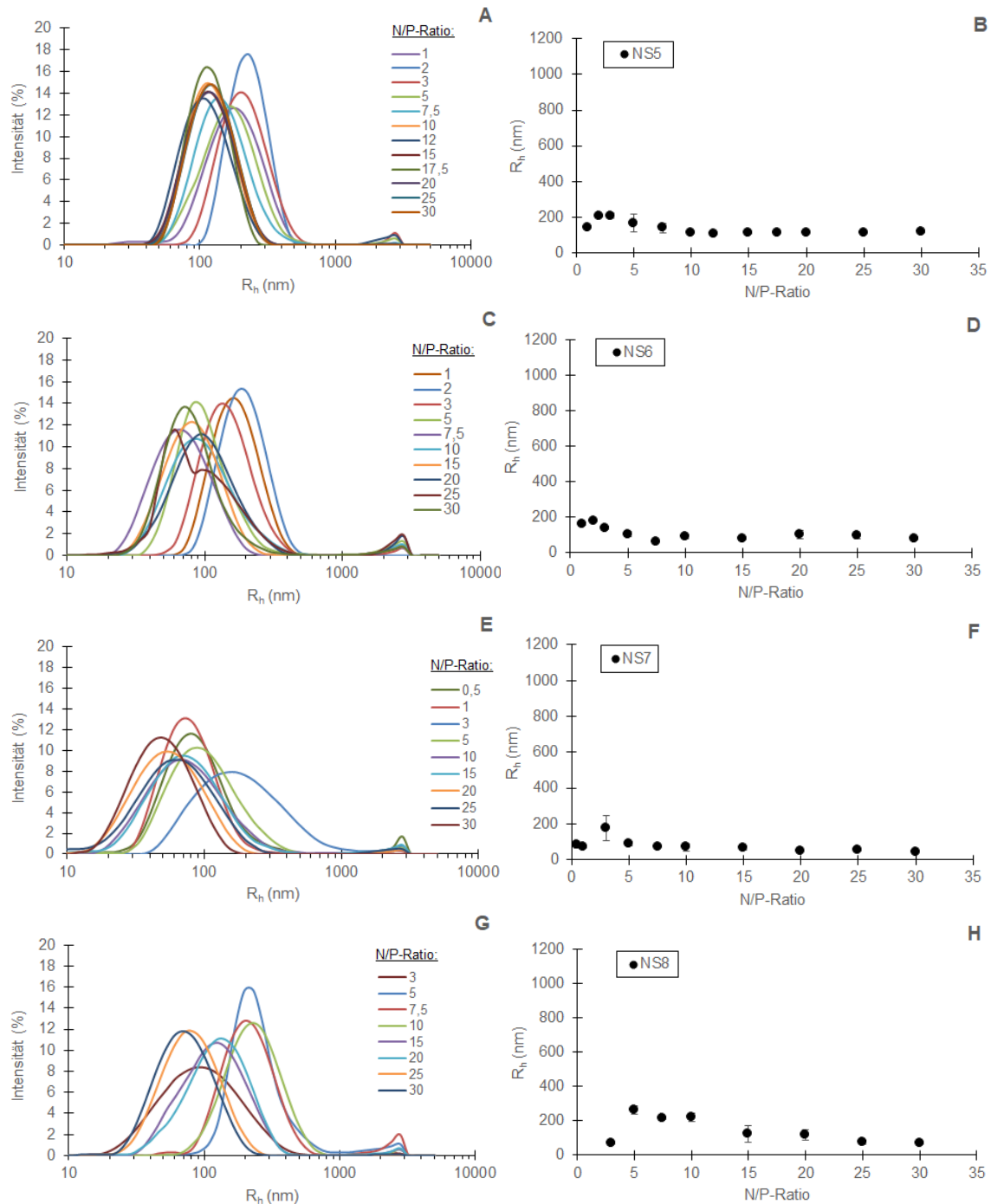


Abbildung 6: Größenmessung von Polyplexen der Nanosterne NS5 – NS8

Es wurden Polyplexe zwischen den Nanosternen und dem Plasmid pEGFP-N1 unter den Bedingungen des Transfektionsprotokolls (siehe Kapitel 1.5) bei verschiedenen N/P-Verhältnissen in serumfreiem Kulturmedium (Opti-MEM) gebildet. Die Partikelgrößen wurden im Zetasizer per DLS gemessen. Gezeigt sind die intensitätsgewichteten Verteilungen (A, C, E, G) sowie gemittelten hydrodynamischen Radien in Abhängigkeit von der N/P-Ratio (B, D, F, H). Verwendet wurden die Nanosterne NS5 (A, B), NS6 (C, D), NS7 (E, F) und NS8 (G, H). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$.

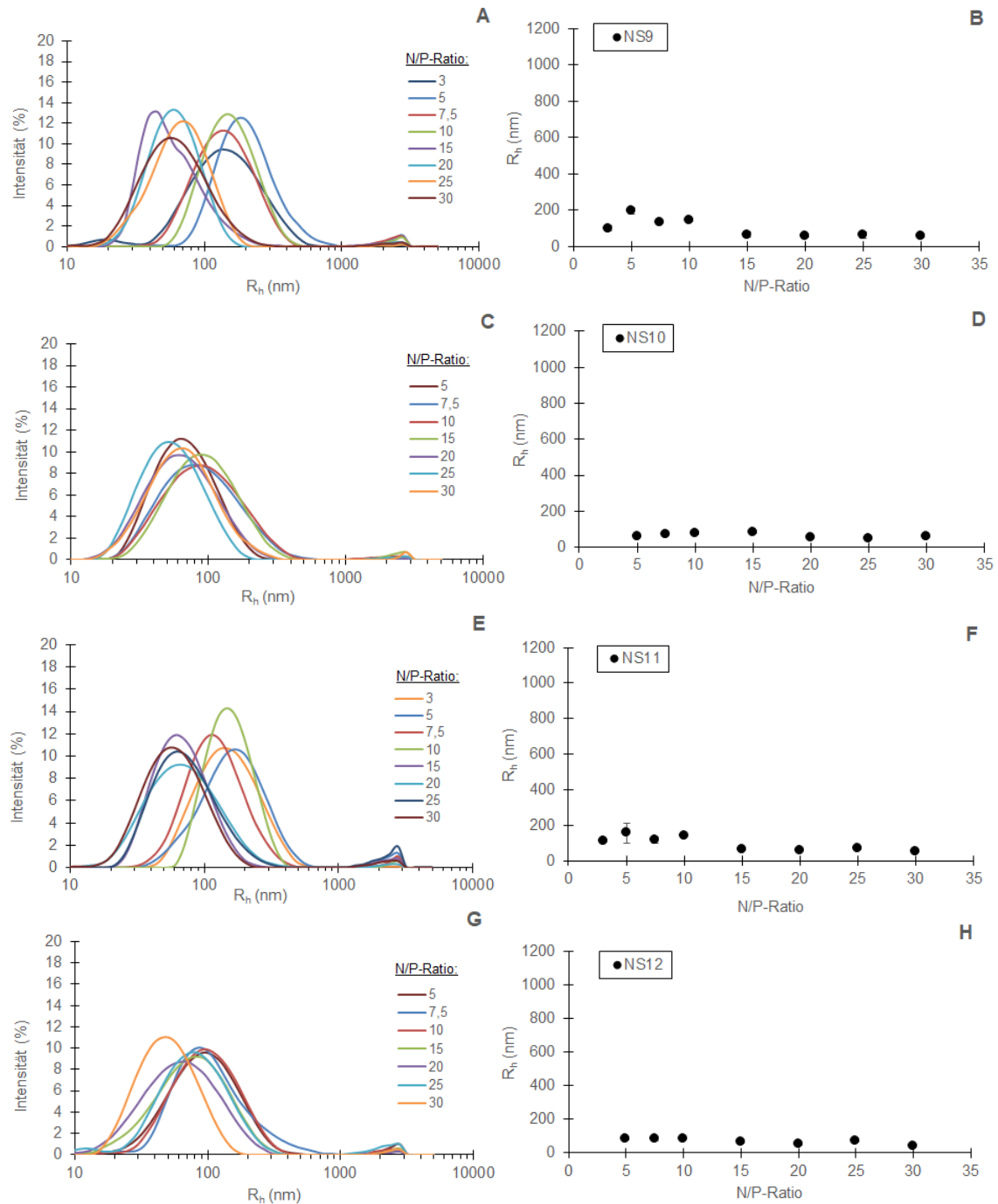


Abbildung 7: Größenmessung von Polyplexen der Nanosterne NS9 - NS12

Es wurden Polyplexe zwischen den Nanosternen und dem Plasmid pEGFP-N1 unter den Bedingungen des Transfektionsprotokolls (siehe Kapitel 1.5) bei verschiedenen N/P-Verhältnissen in serumfreiem Kulturmedium (Opti-MEM) gebildet. Die Partikelgrößen wurden im Zetasizer per DLS gemessen. Gezeigt sind die intensitätsgewichteten Verteilungen (A, C, E, G) sowie gemittelten hydrodynamischen Radien in Abhängigkeit von der N/P-Ratio (B, D, F, H). Verwendet wurden die Nanosterne NS9 (A, B), NS10 (C, D), NS11 (E, F) und NS12 (G, H). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$.

Dabei zeigten alle untersuchten Polyplexe eine Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis, deren Stärke von der Armdichte der involvierten Nanosterne abhing. Deshalb wurden für die Auswertung der hydrodynamischen Radien die Nanosterne basierend auf ihrer Grafting Density wieder analog zu Kapitel 2.2.1 in drei Gruppen unterteilt.

Bei den Nanosternen mit einer geringen Armdichte zeigte die Größenverteilung von NS1 und NS2, dass hauptsächlich zwei Populationen vorhanden sind, eine größere bei 1200 nm und eine mittlere bei 500 bis 800 nm (Abbildung 5 A, C). Ähnliche Werte wurden bei der Entwicklung mittleren hydrodynamischen Radien als Funktion des N/P-Verhältnisses beobachtet. (Abbildung 6, B, D). Dieser Effekt war am ausgeprägtesten für NS1 (0,006 Arme pro nm²) und NS2 (0,011 Arme pro nm²), während die Polyplexe, die mit NS3 (0,024 Arme pro nm²) und NS4 (0,035 Arme pro nm²) gebildet wurden, eine maximale Polyplexgröße von 400 nm besaßen und bereits ähnlich waren zu den Polyplexen, die mit Nanosternen von mittlerer Armdichte gebildet wurden.

Betrachtet man die Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis, konnte bei den Nanosternen NS2 bis NS4 mit steigendem N/P-Verhältnis eine Linksverschiebung der mittleren Population auf der Achse der Größenverteilung beobachtet werden. Dies zeigt sich auch in der sinkenden mittleren Partikelgröße. Einzig bei NS1 führte eine Erhöhung des N/P-Verhältnisses zu einer Zunahme der Partikelgröße. Bei letzterem handelt es sich um den Nanostern mit der geringsten Menge an Polymer pro Nanopartikel (Vergleiche Tabelle 1). Es ist daher denkbar, dass durch die geringe Beladung mit PDMAEMA an der Oberfläche und damit der niedrigen Ladungsdichte, die Abstoßungskräfte der Nanosterne zueinander zu schwach sind und es mit Erhöhung der Konzentration zur Bildung von Aggregationen kommt. Dafür spricht auch das Vorhandensein einer zweiten Population in der DLS-Größenverteilung bei 1200 nm. Die Bildung von Aggregationen ist in Übereinstimmung mit anderen PEI- oder PDMAEMA-gebildeten Polyplexen mit geringem Molekulargewicht oder kürzeren Ketten, die insbesondere bei niedrigen N/P-Verhältnissen eine verringerte kolloidale

Stabilität zeigten.^{25,112} Vermutlich bedingen Polymere mit geringem Molekulargewicht eine schwächere Kondensation der DNA durch die verringerte Zahl an elektrostatischen Interaktionen. Dies führt zu einer verstärkten Bildung von Aggregationen, insbesondere in Medien mit höherer Ionenstärke (wie in diesem Fall Opti-MEM).²² Eisenoxid-Nanopartikel ohne Polymerbeschichtung zeigen ebenfalls eine zeitabhängige Aggregation in verschiedenen Medien, da die Abstoßungskräfte der geladenen Polymere auf der Außenseite fehlen.^{113,114}

Die Polyplexe, die mit den Nanosternen von mittlerer (Abbildung 6), beziehungsweise von hoher Armdichte (Abbildung 7) gebildet wurden, zeigten eine monomodale Verteilung. Die hydrodynamischen Radien stiegen im Bereich von $N/P = 3$ bis $N/P = 10$ zunächst auf bis ≤ 230 nm (mittlere Armdichte) beziehungsweise ≤ 170 nm (hohe Armdichte) an. Die weitere Erhöhung des N/P -Verhältnisses von > 10 führte bei beiden Gruppen zu einer Verkleinerung der mittleren hydrodynamischen Radien und die Größe der Polyplexe stabilisierte sich bei ≤ 119 nm (mittlere Armdichte) beziehungsweise ≤ 79 nm (hohe Armdichte). Bei der Größenverteilung macht sich dies durch eine Linksverschiebung der Intensitätsmaxima mit steigendem N/P -Verhältnis bemerkbar. Die Ursache für dieses Verhalten liegt vermutlich darin begründet, dass sich bei dem N/P -Verhältnis mit der maximalen Polyplex-Größe zugleich der Punkt der Ladungsneutralität des polyelektrolytischen Komplexes befindet (siehe Kapitel 2.2.1). Schwankungen der Polyplex-Größe und Tendenz zur Aggregationsbildung werden dabei typischerweise an diesem Punkt beobachtet, da durch den Ladungsausgleich die Abstoßungskräfte herabgesetzt werden.¹¹⁵

2.2.3 Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Größe von Polyplexen


Die Bedingungen der Polyplexbildung, wie beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke oder Viskosität des Mediums beeinflussen die Größe der gebildeten Polyplexe und damit die Transfektion.¹¹⁶ PDMAEMA zeigt in wässriger Lösung ein doppelt-responsives Verhalten, welches sowohl vom pH-Wert, als auch der Temperatur abhängt. Der „cloud point“, das heißt der Temperaturpunkt, an welchem die Polymere in Lösung nicht mehr stabil sind und Agglomeration stattfindet, ist dabei stark vom pH-Wert abhängig.⁷⁰ In diesem Kapitel sollen der Einfluss von verschiedenen Inkubationsbedingungen, wie die Kinetik der Inkubationstemperatur und der Inkubationsdauer, sowie des Komplexierungsmediums untersucht werden.

In Tabelle 2 sind die verschiedenen Abweichungen vom Standardprotokoll (Ansatz A) dargestellt. Die Variationen lagen dabei beim komplexierten Plasmid sowie den Komplexierungsmedium. Die Komplexierung wurde durchgeführt mit den Plasmiden pEGFP-N1 (wurde in den Transfektionsstudien verwendet) oder pmCherry-N1 oder pZsYellow1-N1 (alle Plasmide: 4,7 kb). Für die Komplexierung wurden die Plasmide zunächst entweder in wässriger NaCl-Lösung (150 mM) oder in HBG (20 mM Hepes, 5 wt% Glukose, pH 5,5) vorgelegt, analog zum Transfektionsprotokoll mit 1 ml Opti-MEM versetzt und zum Schluss die entsprechende Menge des Nanostern NS5 zugesetzt für ein N/P-Verhältnis von 10. Bei einem Ansatz (Tabelle 2, Ansatz B) wurden Plasmid und NS5 direkt in Opti-MEM vermengt. HBG wurde von van Gaal et al. als Matrix für die Polyplex Bildung vorgeschlagen und zeigte in verschiedenen Studien, dass die Verwendung zu effizienteren Transfektionen als in NaCl-Lösung führen kann.^{83,99} Bei Opti-MEM handelt es sich um ein spezielles Zellkulturmedium zur Transfektion von Säugerzellen unter Serum-reduzierten Bedingungen. Es stellt ein modifiziertes MEM-Medium (Eagle's Minimum Essential Media) dar, das mit HEPES und Natriumbicarbonat gepuffert und zusätzlich noch mit Hypoxanthin,

Thymidin, Natriumpyruvat, L-Glutamin, sowie Spurenelementen und Wachstumsfaktoren supplementiert ist.

Tabelle 2: Variation der Zusammensetzung der Polyplex-Ansätze

Gemäß des Standardprotokolls (Ansatz A) wurden zunächst 1 µg des Plasmids in wässriger NaCl-Lösung (150 mM) gelöst, mit 1 ml serumfreiem Kulturmedium (Opti-MEM) versetzt und schließlich die entsprechende Menge an NS5 zugesetzt um auf ein N/P-Verhältnis von 10 zu kommen. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die hydrodynamischen Radien R_h im Zetasizer mittels DLS-Messung bestimmt.



Ansatz	Plasmid		Polyplex-Matrix	Nanostern	R_h (nm)
A	1 µg pEGFP-N1	in 50 µl NaCl-Lösung (150 mM)	+ 1 ml Opti-MEM	+ NS5 (\triangleq N/P 10)	114,6 \pm 0,5
B	1 µg pEGFP-N1	in	1 ml Opti-MEM	+ NS5 (\triangleq N/P 10)	115,0 \pm 0,5
C	1 µg pEGFP-N1	in 50 µl HBG	+ 1 ml Opti-MEM	+ NS5 (\triangleq N/P 10)	116,5 \pm 0,7
D	1 µg pCherry	in 50 µl NaCl-Lösung (150 mM)	+ 1 ml Opti-MEM	+ NS5 (\triangleq N/P 10)	111,8 \pm 1,4
E	1 µg pZsYellow-N1	in 50 µl NaCl-Lösung (150 mM)	+ 1 ml Opti-MEM	+ NS5 (\triangleq N/P 10)	115,1 \pm 3,1

Die Wahl des Mediums für die Polyplexbildung ist entscheidend für die Größe und Stabilität des Komplexes.¹⁰⁰ Polyplexgröße und Topologie der pDNA beeinflussen bei einer Transfektion nicht nur die Aufnahme in die Zelle, sondern auch die Mobilität innerhalb des Zytoplasmas und die Widerstandsfähigkeit gegenüber zytoplasmatischen Nukleasen.¹¹⁷ Allerdings zeigte sich, dass weder die Verwendung eines anderen Plasmids, noch das Vorlegen des Plasmids in einem anderen Lösungsmittel zu einem signifikanten Unterschied der hydrodynamischen Radien führt. Da die Bindung der positiv geladenen Aminogruppen der Nanosterne an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA sequenzunspezifisch erfolgt, ist bei vergleichbarer Plasmidgröße kein Unterschied in der Polyplex-Größe zu erwarten. Da die Komplexbildung zwischen pDNA und Polykation hauptsächlich durch elektrostatische Interaktionen erfolgt, spielt der Grad an Protonierung und damit der pH-Wert eine große Rolle.⁸³ Durch die nachfolgende Zugabe von gepuffertem Opti-MEM beim Transfektionsprotokoll (Kapitel 1.5) ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Polyplexgröße bei diesem N/P-Verhältnis vernachlässigbar.

Im Rahmen des Transfektionsprotokolls werden die Polyplexe vor der Zugabe zu den Zellen für 30 Minuten inkubiert. Um zu untersuchen, wie sich die Kinetik der Polyplexgröße während der Inkubation verhält, wurde mit dem Nanostern NS5, welcher in vorhergegangenen Transfektionsexperimenten gute Ergebnisse lieferte, gemäß den Bedingungen des Transfektionsprotokolls Polyplexe bei verschiedenen N/P-Verhältnissen gebildet und mit einem Messpunkt pro Minute die Änderung der hydrodynamischen Radien über die Zeit hinweg verfolgt (Abbildung 8). Das Plasmid lag folglich in NaCl-Lösung (150 mM) vor und die Polyplex Bildung erfolgte nach Zugabe von 1 ml Opti-MEM (entspricht Ansatz A aus Tabelle 2).

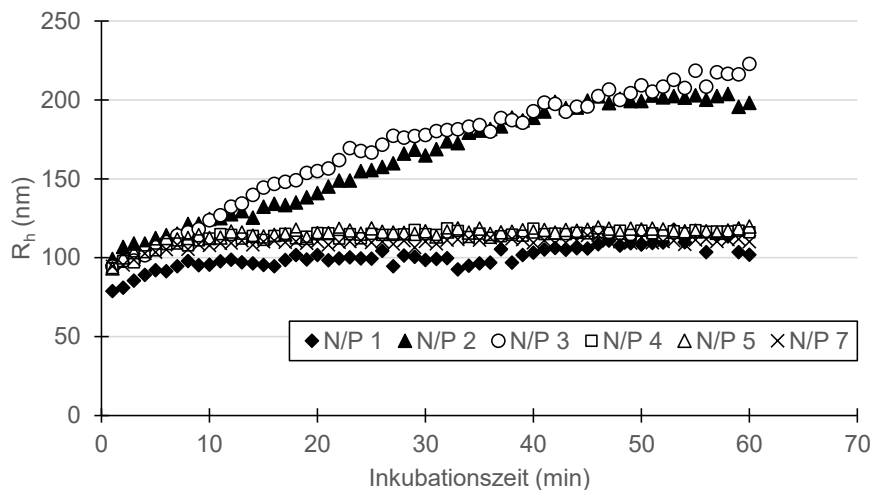


Abbildung 8: Kinetik der hydrodynamischen Radien (R_h) in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis und der Inkubationsdauer

Es wurden Polyplexe zwischen pEGFP-N1 und NS5 gebildet und bei Raumtemperatur über die Zeit hinweg verfolgt. Gemäß dem Transfektionsprotokoll werden die Polyplexe nach 30 min zu den Zellen gegeben (siehe Abbildung 3)

Dabei zeigte sich, dass die hydrodynamischen Radien der Polyplexe zunächst um ~ 20 bis 40 nm zunahmen bis sie nach ungefähr 10 Minuten ein Plateau erreichten und für die verbleibenden 50 min Inkubationsdauer stabil blieben. Die Ausnahme bildeten hier die Polyplexe, welche bei $N/P = 2$ und 3 gebildet wurden und einen konstanten Anstieg der Polyplexgröße über die gesamten 60 min Inkubationsdauer

hinweg zeigten. Ähnliche Aggregationseffekte in einem sehr engen Bereich des N/P-Verhältnisses wurden auch von anderen Forschungsgruppen für verschiedene sternförmige Polymere beobachtet.^{118,119} Mendrek et al. haben dabei geschlussfolgert, dass der Grund hierfür in der Neutralisierung der Oberflächenladung der Polyplexe liegt. Die Messungen des Zetapotentials (siehe Abbildung 6) haben jedoch gezeigt, dass der Punkt des Ladungsausgleichs für die Polyplexe die mit NS5 gebildet wurden, im Bereich $N/P = 7,5 - 10$ liegen muss. Dabei muss angemerkt werden, dass die N/P-Verhältnisse, bei denen Polymer Aggregationen beobachtet wurden, weit unter $N/P = 30$ liegen (entspricht maximaler Transfektionseffizienz für NS5). Die treibende Kraft für die Abstoßung der Nanosterne untereinander liegt folglich in der elektrostatischen Abstoßung der Polymerkorona, unbeschichtete Eisenoxid-Nanopartikel würden zeitabhängig aggregieren.¹¹⁴

Um den Einfluss der Temperatur zu untersuchen, wurden kinetische DLS-Messungen mit NS4 und NS5 durchgeführt, zwei Nanosterne welche im Vorfeld bereits ausführlich charakterisiert worden sind und sehr gute Ergebnisse in Transfektionsexperimenten zeigten. Analog zu Kapitel 2.2.2 wurden die Polyplexe unter den Bedingungen des Standard Transfektionsprotokolls gebildet und mit einem Messpunkt pro Minute die Änderung der hydrodynamischen Radien über die Zeit hinweg verfolgt (Abbildung 9).

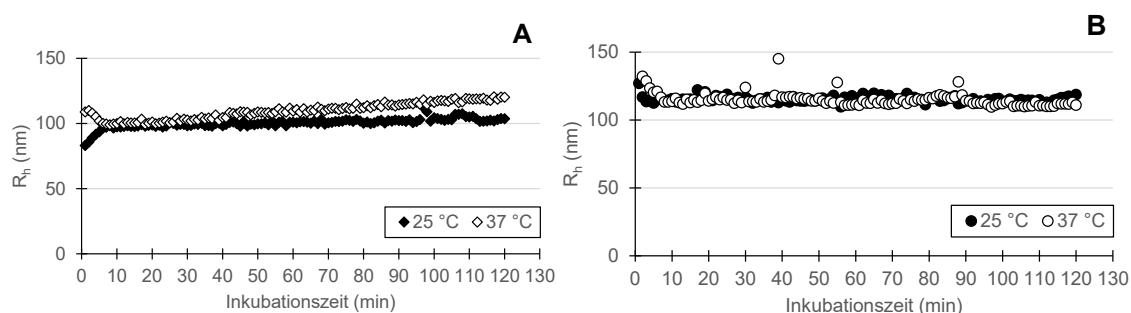


Abbildung 9: Kinetik der hydrodynamischen Radien (R_h) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und –dauer

Es wurden Polyplexe zwischen pEGFP-N1 und NS4 (A) oder NS5 (B) mit einem N/P-Verhältnis von 10 gebildet und bei 25 °C (entspricht Raumtemperatur) sowie 37°C (Entspricht Temperatur im Inkubator) über die Zeit hinweg im Zetasizer verfolgt. Im Rahmen der Transfektionsversuche werden die Polyplexe gemäß dem Standard Protokoll üblicherweise nach 30 min zugegeben.

Das Verhalten ist dabei leicht unterschiedlich für die beiden untersuchten Nanosterne. Während NS5 keine Unterschiede in der Polyplexgröße bei den Temperaturbedingungen des Polyplexbildungsprotokolls (25°C) verglichen zu denen der Zellkultivierung (37°C) zeigte und die Größe über die gesamte Inkubationsdauer von 120 min stabil blieb, zeigten die Polyplexe, welche mit NS4 gebildet wurden, einen leichten Anstieg der Polyplex-Größe bei 37°C. Bei 25 °C war dagegen kein Anstieg zu beobachten. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass gemäß des Transfektionsprotokolls die Polyplexe zunächst bei Raumtemperatur gebildet werden, bevor die Zugabe zu den Zellen und die Kultivierung bei 37°C erfolgen.

2.2.4 Komplex Stabilität

Eine Alternative zu bereits etablierten Methoden wie beispielsweise dem Gel-Retardationssay^{81,120} zur Beschreibung der Stabilität von Polyplexen, stellt der erstmals in Schallon et al., (2011)¹⁰⁶ vorgestellte ΔT -Assay dar, welcher den Vorteil einer qualitativen Untersuchung bietet. Um den Einfluss von kationischen Polymeren auf die DNA-Schmelztemperatur und damit der Komplexstabilität zu untersuchen, wurde pEGFP-N1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I markiert, Polyplexe gebildet und diese schließlich in eine Real Time PCR Maschine überführt. Die Temperatur wurde von 25 auf 95 °C mit einer Rate von 1 °C / min erhöht und die Fluoreszenzintensität bestimmt (SYBR-Green Filter: BP 504 \pm 12 nm). Die Schmelztemperatur der DNA wurde als der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve der relativen SYBR-Green Fluoreszenz (Fluoreszenz bei einer gewählten Temperatur relativ zu der Fluoreszenz der Starttemperatur $T = 25$ °C) als Funktion der Temperatur definiert. Es wurde die lineare Form von PEI („L-PEI“; 25 kDa) als Transfektionsgoldstandard sowie drei verschiedene Nanosterne mit dem ΔT -Assay untersucht, zwei mit einer mittleren Armdichte (NS5: 0,054 Arme per nm², NS6: 0,064 Arme per nm²) und einer mit einer hohen Armdichte (NS12: 0,300 Arme per nm²). Nanosterne mit einer geringeren Armdichte wurden nicht untersucht, da die Größe der resultierenden Polyplexe als zu groß für eine effiziente Transfektion angesehen wurde. Da die kolloidale Stabilität von Polyplexen von den Eigenschaften des Komplexierungsmediums, wie beispielsweise der Ionenstärke oder dem pH-Wert abhängt,¹¹¹ wurden die T_M -Werte für zwei verschiedene Polyplex-Matrizen, HBG (20 mM Hepes, 5 oder 0,5 wt% Glukose, pH 5,5) und wässriger NaCl-Lösung (150 mM), bestimmt. Da gelöster Zucker die Viskosität des Mediums erhöht, was die Größe der gebildeten Polyplexe beeinflussen kann,¹¹⁶ wurden zwei Varianten von HBG, jeweils mit 0,5 oder 5 wt% Glukose, verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zu sehen.

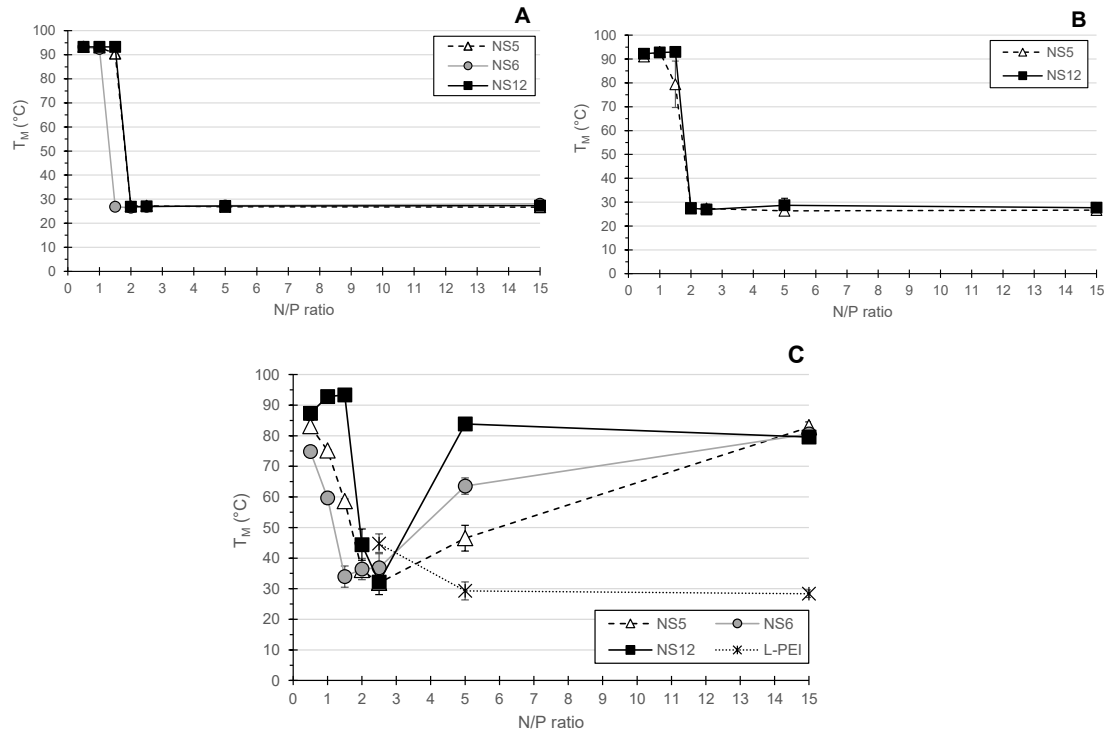


Abbildung 10: DNA-Schmelztemperatur als Funktion des N/P-Verhältnisses

Polyplexe wurden entweder in HBG (5% Glucose, A), HBG (0,5% Glucose, B) oder 150 mM NaCl-Lösung gebildet (C). Linien zwischen Datenpunkten dienen der visuellen Hilfe. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 2$.

Wenn in HBG gebildet, zeigten die Polyplexe der untersuchten Nanosterne ähnliche T_M -Daten, die auf eine starke Bindung hingen. T_M sank abrupt von $\sim 90^\circ\text{C}$ (freie DNA) auf ungefähr 27°C ab für jedes N/P-Verhältnis ≥ 2 . Kein Unterschied war bei der Verwendung von HBG mit 5% Glucose gegenüber der Komplexierung in HBG mit 0,5% Glucose zu sehen. Im Falle der ungepufferten NaCl-Lösung als Matrix war bei $N/P = 2$ eine ähnliche Abnahme der T_M zu beobachten. Mit weiterer Erhöhung des N/P-Verhältnisses jedoch nahm die T_M wieder zu und näherte sich der von freier DNA an. Eine höhere Armdichte der Nanosterne schien dieses Verhalten zu verstärken. Ein pH-Effekt als Ursache könnte dieses Verhalten erklären. Die Arme der Nanosterne bestehen aus PDMAEMA, welches eine schwache polymerische Base darstellt. Der Grad an Protonierung und folglich die Ladungsdichte hängen stark vom pH-Wert ab. L-PEI dagegen zeigt eine deutlich stärkere Reduzierung der

T_M auf bis $\sim 30^\circ\text{C}$. Dies bestätigt vorherige Untersuchungen, dass mit PEI-gebildete Polyplexe stabiler sind als mit PDMAEMA.¹⁰⁶

Um die Auswirkung der Polyplexe auf den pH-Wert der Matrizen zu untersuchen, wurden Polyplexe in HBG und 150 mM NaCl-Lösung gebildet und der pH-Wert mit einer pH-Sonde gemessen. Die Entwicklung des pH-Werts ist in Abbildung 11 zu sehen.

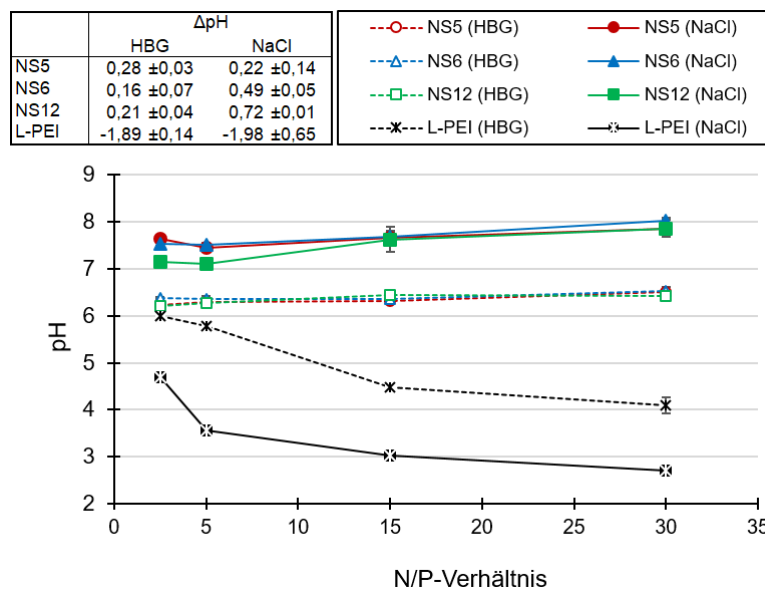


Abbildung 11: pH der Polyplex-Lösung in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis

Polyplexe werden entweder in HBG (5% Glucose, leere Symbole) oder ungepufferter 150 mM NaCl-Lösung (ausgefüllte Symbole) angesetzt. Linien zwischen Datenpunkten dienen der visuellen Unterstützung. Der pH-Wert der freien pDNA betrug $6,87 \pm 0,39$ in NaCl-Lösung und $6,21 \pm 0,07$ in HBG. Die Berechnung des ΔpH erfolgte durch pH bei $N/P = 30$ minus dem pH bei $N/P = 2,5$. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 2$.

In der gepufferten HBG-Matrix zeigte der pH bei Zugabe der Nanosterne wenig Änderung mit dem N/P-Verhältnis. Mit der Berücksichtigung der Standardabweichung zeigte sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Nanosternen. Dies spiegelt das Verhalten der Nanosterne beim ΔT -Assay wieder. Im Falle der NaCl-Matrix zeigte sich eine

deutliche Korrelation des ΔpH mit Armdichte. Während der ΔpH bei $0,22 \pm 0,14$ betrug, war der pH-Anstieg bei NS6 ($0,49 \pm 0,05$) und NS12 ($0,72 \pm 0,01$) deutlicher ausgeprägt.

Kationische Polymere zeigen eine pH-abhängige Interaktion mit DNA, bei welcher Polymere mit einer hohen Ladungsdichte eine stärkere Bindung an die DNA zeigen.¹²¹ Die Protonierung und damit das Absenken des pH-Wertes ermöglicht das Hinzufügen eines zusätzlichen Protons an die funktionellen Aminogruppen des Polymers.²¹ Umgekehrt würde ein Ansteigen des pH-Werts und damit einer Verringerung der Protonierung ein Herabsetzen der Bindungsstärke des Polykations an die DNA und der Polyplex Stabilität bewirken.¹²² Bei pH 8 würde der Grad an Protonierung von PDMAEMA weniger als 50% betragen ($\text{pK}_a = 7,5$).^{89,123}

Ein pH-Effekt könnte eine Erklärung für das Verhalten der Nanosterne beim ΔT -Assay in NaCl-Lösung darstellen (Abbildung 10 C). Folglich würde der Anstieg des pH-Werts zu einer Abnahme der Ladungsdichte und damit zu einer Destabilisierung der Polyplexe führen. Eine hohe Armdichte scheint diesen Effekt noch zu verstärken. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Anwesenheit von protonierten Seitengruppen die Protonierbarkeit von benachbarten Aminogruppen verringert. Dieses Phänomen wurde auch für andere kationische Polymere beschrieben.^{89,124} Ein Ansteigen der Armdichte sollte daher in einem geringeren Grad an Protonierung resultieren und als Konsequenz zu weniger stabilen Polyplexen und sonst vergleichbaren Bedingungen führen. Dies würde den beobachteten Einfluss der Armdichte auf die Stabilität von in Na-Cl Lösung als Matrix gebildeten Komplexen erklären.

An dieser Stelle muss jedoch auch erwähnt werden dass, wie in Kapitel 3 gezeigt, selbst im Bereich der N/P-Verhältnisse einer effizienten Transfektion Aggregationen in NaCl-Lösung kein Problem darstellten. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass wenn die Standard NaCl-Matrix durch ein gepuffertes Medium wie HBG ersetzt wird,

eher der Grad an Protonierung und daraus als Konsequenz die Polyplex Stabilität als die Polyplex Größe beeinflusst wird und dass dieses Verhalten eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität spielt. Der „cloud point“ der Nanosternen liegt bei pH 8 bei ungefähr 50 °C,⁷⁰ eine Temperatur die unter den Standard Bedingungen der Zellkultivierung und Transfektion normalerweise nicht erreicht wird: Die Polyplexe wurden bei Raumtemperatur gebildet, die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C.

3. Transfektion mit NP@PDMAEMA Nanosternen

3.1 Einleitung

Ein wichtiger Grund, warum virale Genvektoren gegenüber nicht-viralen heute immer noch den Hauptanteil aktueller klinischer Studien ausmachen,⁷ ist die wesentlich höhere Effizienz beim Gentransfer. Ein wichtiges Ziel bei der Erforschung neuartiger Transfektionsagenzien liegt daher in der Optimierung im Hinblick auf eine hohe Transfektionseffizienz bei möglichst geringer Zytotoxizität.¹²⁵ Im Folgenden soll nun untersucht werden, welche Faktoren Einfluss auf die Transfektion nehmen. Die erste Messgröße einer erfolgreichen Transfektion stellt die Transfektionseffizienz dar. Um die Zahl an transfizierter Zellen zu bestimmen, wurden Polyplexe zwischen den Nanosternen und dem Plasmid EGFP-N1 gebildet. Dieses enthält das Reportergen, welches für EGFP (engl. *Enhanced Green Fluorescent Protein*) kodiert, einer rekombinanten Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Die Genexpression steht dabei unter der Kontrolle des "CMV immediate early promoter" (= engl. **Cytomegalovirus**), einem sehr starken Promotor viralen Ursprungs, der zusammen mit dem SV40 Promotor einen der am häufigsten verwendeten Promotoren für Expressionsvektoren in Säugerzellen darstellt.¹²⁶

Bei einer Transfektion fluoreszieren die Zellen, welche das Protein exprimieren, bei Bestrahlung mit blauem Licht grün und ermöglichen dadurch die Bestimmung des Anteils an transfizierten Zellen. Dieser Anteil wird als Transfektionseffizienz definiert. Des Weiteren ermöglicht die Messung mittels Durchflusszytometrie¹²⁷ die Bestimmung der Intensität der Genexpression. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Zellen in einer Flusszelle an einem Lichtstrahl entlang vorbeigeleitet. Das daraus resultierende Streulicht ist charakteristisch für die Form, Größe und Art der Zelle und wird über den Seitwärtsstreulichtdetektor (SSC = Side Scatter) und Vorwärtsstreulichtdetektor (FSC = Forward Scatter) gemessen. Durch den Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und Filtern wird die Detektion von (Fluoreszenz-) Farbstoffen möglich. Da die Intensität der Fluoreszenz mit der Expression des Genprodukts korreliert, das heißt der Menge an gebildetem EGFP, wird dadurch die Bestimmung des Transkriptionslevels möglich. Die Zellen wurden dabei in drei Kategorien eingeteilt: Low-Producer: Fluoreszenzintensität zwischen 1 und 10 MFI (engl. Mean Fluorescence Intensity); Middle-Producer: Fluoreszenzintensität zwischen 10 und 100 MFI; High-Producer: Fluoreszenzintensität > 100 MFI in der nicht-apoptotischen Zellpopulation. Die Transfektionseffizienz wurde in CHO-K1, HEK-293, L929- und Jurkat Zellen untersucht. Bei den CHO-K1 Zellen handelt es sich um eine aus Ovarien der chinesischen Hamsterart *Cricetulus griseus* isolierte Zelllinie, die breite Anwendung bei rekombinant erzeugten Therapeutika findet.^{128,129} L929-Zellen stellen eine adhärent wachsenden Zelllinie von Mausfibroblasten dar, welche häufig für Zytotoxizitätsstudien verwendet werden.^{130–132} Bei den Jurkat Zellen handelt es sich um eine Leukämie-Zelllinie aus menschlichen T-Lymphozyten, die im Gegensatz zu den adhärent kultivierten CHO-K1 und HEK-293 Zelllinien in Suspension gehalten wurden. Sie sind interessant für die Forschung für verschiedene Untersuchungen der Mechanismen bei der Krebstherapie, der Charakterisierung der T-Zell-Rezeptoren Signalkaskade und durch ihre Fähigkeit Interleukin-2 produzieren zu

können.¹³³ Wie auch andere T-Zelllinien gelten Jurkats als eher schwierig zu transfizieren.¹³⁴ Die Hek-293 (engl. human embryonic kidney) Zellen stellen menschliche embryonale Nierenzellen dar und werden als vergleichsweise einfach zu kultivierende und transfizierende Zelllinie standardmäßig sowohl in der Grundlagenforschung als auch bei der Entwicklung von Chemotherapeutika, Virenimpfstoffen, sowie zur Produktion von rekombinanten Adenovirus-Vektoren verwendet.¹³⁵

Der zweite wichtige Parameter bei einer Transfektion ist die Viabilität. Da viele kationische Polymere wie PEI oder PDMAEMA eine zytotoxische Wirkung zeigen,^{18,136} ist die Zellviabilität für die Optimierung einer möglichst effizienten Transfektion besonders wichtig. Da es sich bei PDMAEMA wie auch bei PEI um ein synthetisches Polymer handelt, welches bei physiologischem pH nur teilweise protoniert vorliegt, wird davon ausgegangen, dass es ebenfalls durch den „proton sponge“ Effekt die Endosomen verlässt und der Mechanismus der Transfektion somit ähnlich ist.⁸⁹ Für die Bestimmung der Toxizität einer Substanz gibt es verschiedene Methoden. Eines der gängigsten Verfahren beinhaltet die Verwendung eines Farbstoffs, der die Unterscheidung zwischen lebendigen und toten Zellen ermöglicht. Bei den Transfektionsexperimenten wurde hierzu Propidiumiodid (PI) verwendet. Bei diesem Fluoreszenzfarbstoff handelt es sich um einen Nukleinsäureinterkalator, der nicht die Zellmembran von lebendigen Zellen überwinden kann.^{137,138} Wenn die Zellen jedoch sterben, wird die Zellmembran löchrig und Propidiumiodid kann ins Zellinnere diffundieren und die DNA und RNA der Zelle anfärben, was als rote Fluoreszenz messbar wird.

Allerdings erlauben diese Farbstoffe keine Aussage über den metabolischen Zustand der Zelle. Für Transfektionen zum Zweck biotechnologischer Anwendungen wie beispielsweise der Erzeugung biopharmazeutischer Produkte (Antikörper, rekombinante Proteine uvm.) ist es jedoch von Interesse, dass durch den Transfektionsprozess die Leistungsfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigt wird.

Dies könnte beispielsweise in einer verringerten Stoffwechselaktivität oder einer geringeren Teilungsrate der transfizierten Zellen resultieren. Darüber alleine lässt sich mit der Untersuchung der Membranpermeabilität noch keine Aussage treffen. Der MTT-Assay dagegen ist ein nach ISO 10993-5 genormter kolorimetrischer Test, der über die Messung der metabolischen Aktivität der untersuchten Zellen eine Aussage über die Zytotoxizität der untersuchten Substanz erlaubt.¹³⁹ Der Test basiert auf der Stoffwechselumsetzung des gelben wasserlöslichen Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; ein Tetrazoliumsalz) zu dem blau-violetten wasserunlöslichen Formazan (Abbildung 12).^{140,141} Das ISO 10993-5 Protokoll sieht dabei die Verwendung von L929 Zellen vor. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden zusätzlich noch CHO-K1 Zellen getestet.

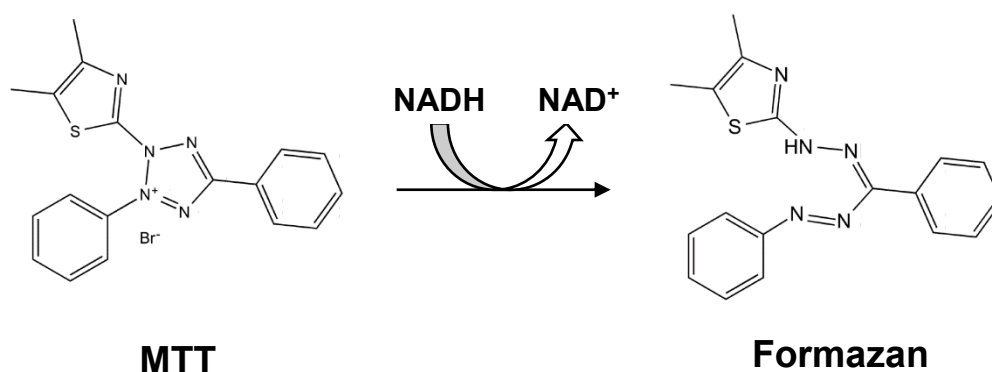


Abbildung 12: Umsetzung von MTT zu Formazan

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Charakterisierung des Nanosterns NS4

Als erste Variante der Nanosterne der zweiten Generation (mit Silicahülle) lag der Nanostern NS4 NP@(PDMAEMA₅₄₀)₉₁ vor. Mit diesem wurden Polyplexe, welche nach dem ursprünglichen und dem adaptierten Transfektionsprotokoll gebildet wurden, per DLS-Messung verglichen und per MTT-Assay die Zytotoxizität (über Bestimmung der metabolischen Aktivität) sowie in Transfektionsexperimenten die Transfektionseffizienz und die Zytotoxizität (über Bestimmung der Membranintegrität) untersucht.

3.2.1.1 Auswirkung des Transfektionsprotokolls auf die Größe der Polyplexe

Das Transfektionsprotokoll wurde von dem adaptiert, welches für die erste Generation der Nanosterne⁷⁰ verwendet wurde. Dabei zeigte es sich, dass die Art der Polyplex Bildung erheblichen Einfluss auf den Transfektionserfolg hat. Wurden die Polyplexe direkt in 1 ml Opti-MEM (dem Transfektionsmedium) gebildet, statt in 200 µl NaCl-Lösung (150 mM), so führte dies sowohl zu einer höheren Zahl an transfizierten Zellen, als auch zu einer Verringerung der Zytotoxizität. Da die Interaktion der pDNA mit dem Polykation hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen geschieht, spielen Faktoren wie die ionische Stärke und der pH-Wert des Mediums eine entscheidende Rolle bei der Polyplex-Bildung. Die Bedingungen der Komplexbildung wie beispielsweise der Zusammensetzung des Komplexierungsmediums, des Reaktionsvolumens oder der Inkubationstemperatur können den Ausgang der Transfektion maßgeblich mitbeeinflussen.^{44,83,84}

Um die Auswirkungen der verschiedenen Protokolle zu untersuchen, wurden Polyplexe mit dem Nanostern NS4 jeweils nach dem ursprünglichen und dem adaptierten Protokoll gebildet und die Größe per DLS-Messung bestimmt. Dabei

zeigte sich, dass die Polyplexe, die nach dem adaptierten Protokoll gebildet wurden, im untersuchten Bereich von $N/P = 3$ bis 10 durchweg deutlich kleiner waren (Abbildung 13).

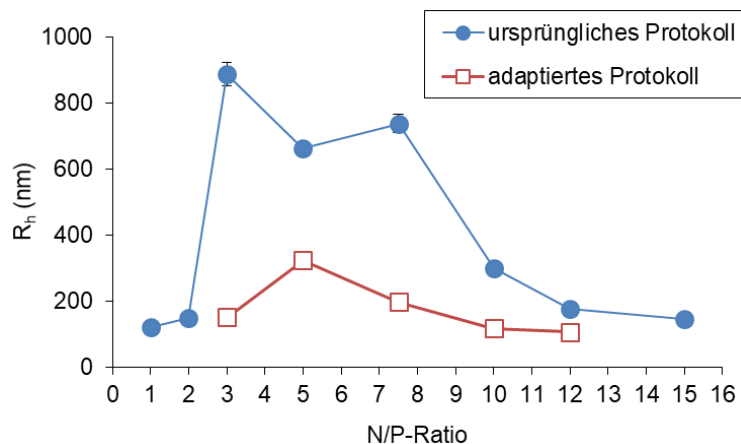


Abbildung 13: Größenmessung der Polyplexe abhängig vom N/P-Verhältnis und dem verwendeten Protokoll

Die Polyplexe wurden mit NS4 und dem Plasmid EGFP-N1 bei Raumtemperatur entweder nach dem ursprünglichen (V1) oder dem adaptierten (V2) Protokoll gebildet und nach 30 min Inkubationszeit die Größe im Zetasizer per DLS bestimmt. V1: 1 µg pDNA werden mit 150mM wässriger NaCl-Lösung zu einem finalen Volumen von 200 µl angesetzt. Anschließend Zugabe der Nanosterne und vortexen. V2: 1 µg pDNA werden in 50 µl von 150 mM NaCl-Lösung gelöst und mit 1 ml Opti-MEM Transfektionsmedium vermischt. Anschließend Zugabe der Nanosterne und vortexen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$.

Ab $N/P \geq 10$ sanken die hydrodynamischen Radien auf Werte vergleichbar zum adaptierten Protokoll von < 300 nm. Die Bedeutung der Polyplexgröße für die Transfektion wurde bereits für vielerlei kationische Polymere beschrieben.^{86,142} Wichtige Einflussfaktoren der Transfektion wie Endozytoserate, Zytotoxizität und der Transport durchs Zytoplasma korrelieren mit der Größe.^{86,143,144} Die genauen Anforderungen an die Partikelgröße variiert je nach Zelllinie, aber liegen für die

meisten Zellen bei der Endozytose in der Größenordnung von $< 200 \text{ nm}$, Makropinozytose 500 bis 1000 nm und Phagozytose bis $10 \text{ }\mu\text{m}$.¹⁴⁵

Darüber hinaus suggerieren die Daten aus Kapitel 2.2.4, dass der Wechsel von einem ungepufferten zu einem gepufferten Medium zu einer Erhöhung der Polyplex-Stabilität führen kann. Die Erhöhung des Volumens und die Verwendung eines gepufferten Komplexierungsmediums statt der NaCl-Lösung erwiesen sich als vorteilhaft für die Transfektion.⁸¹ Eine weitere Ursache könnte dabei die Verkleinerung der Polyplexgröße darstellen. Daher wurde das adaptierte Protokoll als das Standardprotokoll dieser Arbeit definiert und alle nachfolgenden Transfektionsexperimente damit durchgeführt. Schemata des ursprünglichen (Abbildung 46) und adaptierten (Abbildung 47) Protokolls für die Polyplex-Bildung sind im Material und Methoden Teil des Anhangs aufgeführt (Kapitel 8.2.4.2). Ein Teil der Transfektionsstudien mit dem ursprünglichen Protokoll sind ebenfalls in Kapitel 8.1.2 im Anhang zu finden.

3.2.1.2 Untersuchung der Zytotoxizität über die Stoffwechselaktivität

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde der Nanostern NS4 NP@(PDMAEMA₅₄₀)₉₁ gegen den Transfektions-Goldstandard L-PEI (25 kDa) mittels Hilfe des MTT-Assays^{140,141} untersucht. Hierzu wurden CHO- und L929-Zellen zunächst für 24h mit dem jeweiligen Transfektionsagenz inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht und das MTT-Substrat zusammen mit frischem Kulturmedium zu den Zellen gegeben und diese für weitere 2 h inkubiert. Die Menge an gebildetem Formazan entspricht dabei der metabolischen Aktivität der Zellen und wurde photometrisch über Messung der OD₅₈₀ bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Polymere die metabolische Aktivität konzentrationsabhängig beeinflussten. In Tabelle 3 sind die ermittelten LC₅₀ Werte

aufgeführt, die hierfür verwendeten Regressionskurven sind im Anhang gezeigt (siehe Kapitel 8.2.4.4).

Tabelle 3: Zytotoxizität der Nanosterne NS4 und von L-PEI

Bestimmt wurde die mittlere letale Konzentration (LC_{50}) gemäß ISO 10993-5. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$. Die Werte für die L929 Zellen (*) wurden im Rahmen der Masterarbeit ermittelt und sind zum Vergleich mitaufgeführt.

Polymer	Zelltyp	LC_{50} [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
L-PEI (25 kDa)	L929	0,015 \pm 0,002*
NS4	L929	0,025 \pm 0,003*
L-PEI (25 kDa)	CHO	0,014 \pm 0,001
NS4	CHO	0,013 \pm 0,001

In den CHO-Zellen lagen die mittleren LC_{50} Werte bei $0,014 \pm 0,001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dies entspricht dem LC_{50} -Wert, der für L-PEI während der Masterarbeit in L929-Zellen bestimmt wurde, die Zytotoxizität von NS4 war in L929-Zellen mit $LC_{50} = 0,025 \pm 0,003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ noch etwas geringer. Die Zytotoxizität von Transfektionsagenzien variiert typischerweise je nach verwendeter Zelllinie.^{1,146} Trotz des höheren Molekulargewichts ist die Zytotoxizität des Nanosterns NS4 (7735 kDa) jedoch nicht höher als die des gegenwärtigen Transfektions-Goldstandards L-PEI (25 kDa).

3.2.1.3 Vergleich der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität in verschiedenen Zelllinien

Um die Transfektionsleistung von NS4 in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden Polyplexe aus pEGFP-N1 und NS4 gebildet und mit diesen gemäß des Standard Transfektionsprotokolls L929- sowie CHO-Zellen transfiziert (Abbildung 14).

Dabei zeigte sich, dass bei der Transfektion mit dem Nanostern NS4 abhängig vom Zelltyp und dem N/P-Verhältnis die Transfektionseffizienz erheblich schwanken kann.

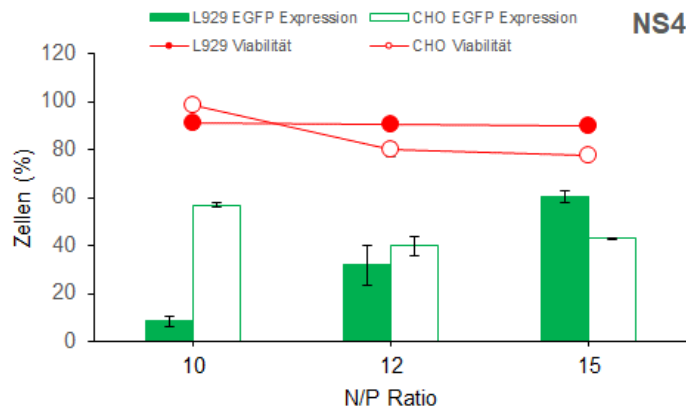


Abbildung 14: Transfektion von L929- & CHO Zellen bei verschiedenen N/P-Verhältnissen

Es wurden Polyplexe aus dem Plasmid EGFP-N1 und dem Nanosternen NS4 gebildet und damit L929- oder CHO-K1 Zellen nach dem Standard Transfektionsprotokoll transfiziert und nach 42 bis 47h Inkubation die Transfektionseffizienz und Viabilität bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 2$

In L929-Zellen korrelierte die EGFP-Expression deutlich mit dem N/P-Verhältnis und erst bei $N/P = 15$ wurde das Maximum von 60% EGFP-positiver Zellen erreicht. Die CHO-Zellen dagegen verfügten bereits bei $N/P = 10$ über einen Anteil von 57% EGFP-positiver Zellen, der mit Erhöhung des N/P-Verhältnisses wieder leicht absank auf 40%. Unabhängig von der verwendeten Zelllinie oder dem N/P-Verhältnis lagen die gemessenen Viabilitäten durchgehend bei $> 80\%$, die Zytotoxizität korrelierte dabei mit dem N/P-Verhältnis. Bis auf eine Ausnahme war die Viabilität der CHO-Zellen stets 5 – 10% geringer als die der L929-Zellen. Auch beim MTT-Test war die Zytotoxizität in L929-Zellen gegenüber den CHO-Zellen erhöht (siehe Tabelle 3). Die hydrodynamischen Radien der Polyplexe lag im Bereich von 100 bis 300 nm, was eine noch für die Transfektion geeignete Größe darstellt. In der Regel sollten Nanopartikel für eine effiziente Transfektion eine Größe von 500 nm nicht übersteigen.⁸⁶ Auch eine Partikelgröße von unter 50 nm kann in

eine verminderte Aufnahme in die Zelle zur Folge haben.¹⁴⁷ Die Polyplexe, welche nach dem ursprünglichen Protokoll gebildet wurden, erreichten hydrodynamische Radien von bis zu 900 nm (Abbildung 13).

3.2.1.4 Abschließende Betrachtung der Ergebnisse

Die Konzentrationen der letalen Dosis lagen bereits im Konzentrationsbereich, welcher bei einer Transfektion erreicht wird (Für N/P = 30: 0,025 µg/µl bei NS4). Dass bei den Transfektionen dennoch $\geq 80\%$ Viabilität gemessen wurde liegt vermutlich daran, dass gemäß des Transfektionsprotokolls nach 4h das Transfektionsmedium durch herkömmliches Kulturmedium ausgetauscht wird, wodurch die freien sich noch in Lösung befindlichen Polyplexe entfernt werden. Das ISO 10993-5 Protokoll des MTT-Tests dagegen sieht vor, dass die Zellen 24 h mit der zu testenden Substanz inkubiert werden. Tatsächlich zeigten Zellen bei Transfektionsexperimenten mit gleichem N/P-Verhältnis eine um bis zu 20 % verringerte Viabilität, wenn die Polyplexe über Nacht auf den Zellen gelassen wurden (Siehe Kapitel 4.2.2.1). Die wesentlich längere Exposition der Zellen mit dem toxischen Polymer führte dadurch zu einer erhöhten Zytotoxizität. Darüber hinaus ist unklar, wie vergleichbar die Toxizitätswerte sind, wenn sie mit verschiedenen Methoden bestimmt wurden. Der MTT-Test bestimmt die Stoffwechselaktivität, die Propidiumiodid Methode dagegen basiert auf Messung der Membranpermeabilität. Als Ursache für die Zytotoxizität von kationischen Polymeren sind viele verschiedene Faktoren möglich. Für Polymere wie PAMAM oder PEI wurde beispielsweise gezeigt, dass diese Löcher in der Zellmembran verursachen können, die in größerem Ausmaß zum Tod der Zelle führen können.^{148–150} Für PDMAEMA ist die Datenlage widersprüchlich und ein direkter Zusammenhang mit der Disruption der Plasmamembran konnte noch nicht zweifelsfrei gezeigt werden.^{80,151} Auch eine Disruption der Kernhülle wird als möglicher Mechanismus für die Zytotoxizität

diskutiert.¹⁵² Als ein weiterer Mechanismus kann umfangreiches Platzen der Lysosomen zum induzierten Zelltod führen,¹⁵³ allerdings gibt es Hinweise darauf, dass dies im Gegensatz zu PEI bei PDMAEMA nicht die Ursache darstellt und noch weitere molekulare Mechanismen für die Zytotoxizität existieren müssen,¹⁵⁴ welche sich je nach untersuchter Zelllinie und Konzentration unterscheiden können.¹⁵¹

3.2.2 Anpassung des N/P-Verhältnis für die Transfektion

Es wurde bereits in der vorangegangenen Masterarbeit gezeigt, dass Transfektionseffizienz und Zytotoxizität der Nanosterne mit dem N/P-Verhältnis der zugegebenen Polyplexe korreliert,⁸¹ ein typisches Phänomen polykationischer Transfektionsagenzien.^{110,136} Ist die Konzentration zu gering, exprimieren weniger Zellen später das Reportergen. Da die meisten polykationischen Transfektionsagenzien ab einer kritischen Konzentration zytotoxisch wirken, verursacht eine zu hohe Konzentration dagegen eine Verringerung der Viabilität und damit ebenfalls eine Beeinträchtigung der Transfektion.¹⁵⁴ Für die meisten Arbeitsgruppen ist daher die Anpassung des N/P-Verhältnisses die übliche Maßnahme um eine effiziente Transfektion zu erreichen.^{82,86,110} Dafür wird in der Regel die DNA-Menge konstant gehalten und Menge an zugegebenem Polymer erhöht, beginnend von dem N/P-Verhältnis, welches notwendig ist, um positiv geladene Polyplexe zu erhalten. Erhöht man von diesem Punkt aus das N/P-Verhältnis weiter, so steigt der Anteil an freiem Polykation im Transfektionsmix, was die Aufnahme der Polyplexe in die Zelle fördert.¹⁵⁵ Das optimale N/P-Verhältnis kann dabei je nach verwendetem Polymer oder Zelllinie variieren. Alternativ könnte das N/P-Verhältnis auch eingestellt werden, indem die Menge an Polymer konstant gehalten wird und die Menge an pDNA variiert wird. Dieses Vorgehen könnte sich beispielsweise bei Polymeren mit hoher Zytotoxizität als vorteilhaft erweisen, um die absolute Menge an Polymer zu reduzieren, ohne das Konzentrationsverhältnis zwischen pDNA und Polymer zu variieren. Um den Einfluss des N/P-Verhältnisses

auf die Transfektion näher zu untersuchen, wurden drei verschiedene Zelllinien (CHO-K1, HEK-293 und Jurkat Zellen) mit Polyplexen, gebildet aus NS5 und pEGFP-N1, transfiziert. Dabei wurde die Menge an pDNA variiert und bei verschiedenen N/P-Verhältnissen die Transfektionseffizienz und Viabilität untersucht (Abbildung 15).

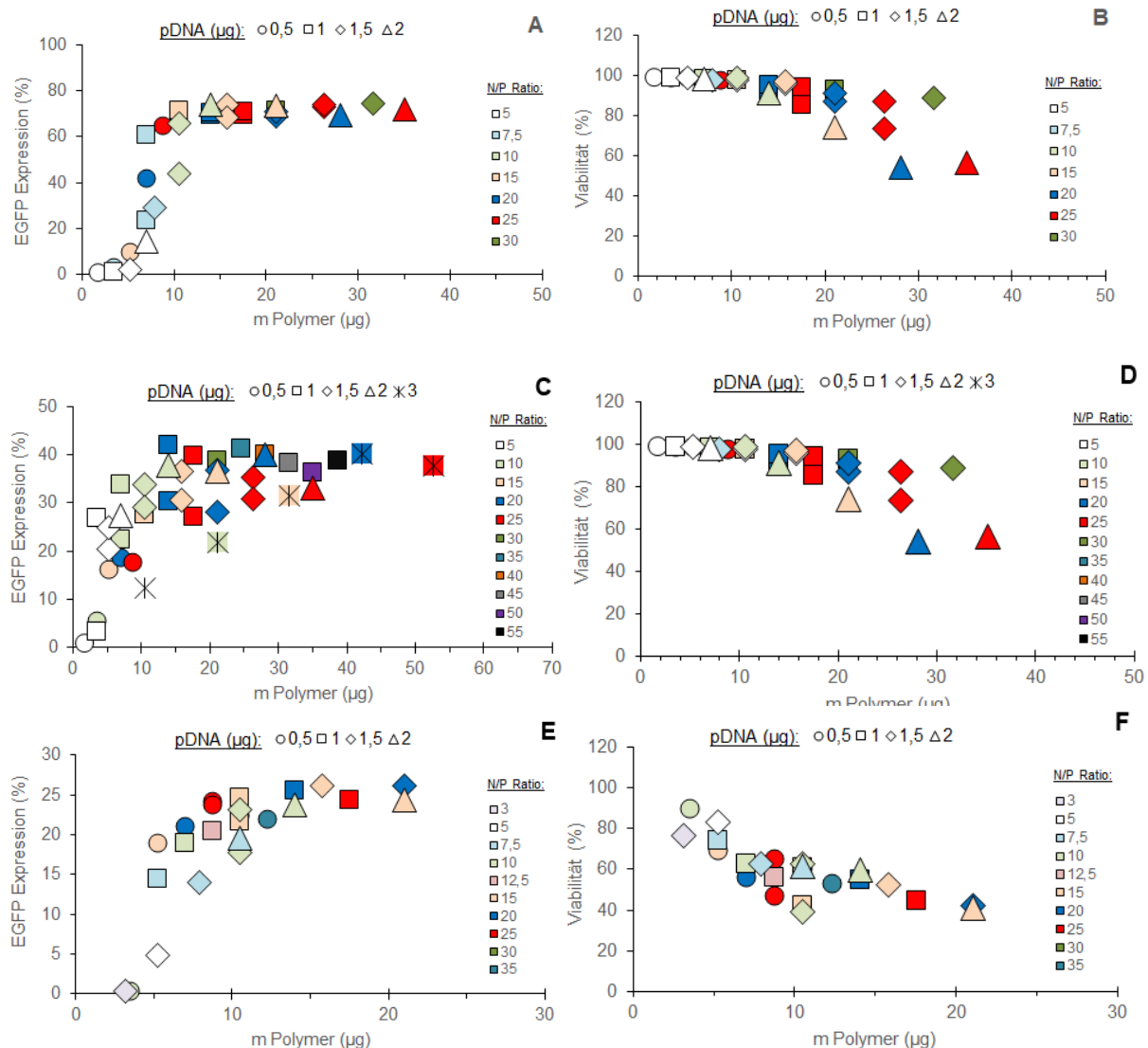


Abbildung 15: Einfluss des N/P-Verhältnisses auf die Transfektion

Es wurden Polyplexe aus dem Plasmid EGFP-N1 und dem Nanostern NS5 gebildet und damit CHO-K1 (A, B), HEK-293 (C, D) und Jurkat (E, F) Zellen nach dem Standard Transfektionsprotokoll transfiziert und nach 27h Inkubation die Transfektionseffizienz (A, C, E) und Viabilität (B, D, F) bestimmt. Dabei wurden sowohl N/P-Verhältnis (Färbung) als auch die Menge an eingesetzter pDNA (Symbole) variiert. Die Datenpunkte entsprechen einzelnen Messungen.

Werden die Transfektionseffizienzen als Funktion der Menge an zugegebenem Polymer graphisch aufgetragen, dann zeigte sich, dass die Zahl an EGFP-positiven Zellen hauptsächlich von der Menge an zugegebenem Polymer abhing und weniger vom N/P-Verhältnis oder der Menge an eingesetzter pDNA. Insbesondere bei der Transfektion von CHO-Zellen (Abbildung 15 A) offenbarte sich ein sigmoidaler Verlauf. Bei 5 bis 10 µg an zugegebenem Polymer zeigte sich ein rascher Anstieg der Transfektionseffizienz von maximal 10% EGFP-positiver Zellen auf bis 70%. Mit weiterer Erhöhung der Polymermenge konnte die Transfektionseffizienz nur noch unwesentlich gesteigert werden, das Maximum lag bei 75% (1,5 µg pDNA, N/P = 30). Darüber hinaus lag der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bei >10 µg zugegebenem Polymer, unabhängig vom N/P-Verhältnis oder der pDNA-Menge, durchgehend bei mindestens 70%. Betrachtet man allerdings die gemessenen Viabilitäten (Abbildung 15 B) zeigt sich der typische Verlauf einer Transfektion mit polykationischen Polymeren: Eine Erhöhung der Polymermenge führte zu einer Verringerung der Viabilität, allerdings scheint für die Viabilität auch das N/P-Verhältnis und die DNA-Menge eine Rolle zu spielen. Besonders deutlich wird dies beispielsweise im Falle eines N/P-Verhältnisses von 5, bei welchem alle gemessenen Viabilitäten bei $\geq 98\%$ lagen. Bei den HEK-293 und den Jurkat Zellen ist der Verlauf ähnlich, bei letzteren sanken die Viabilitäten bei hohen Polymerzugaben bis auf 40% ab (Abbildung 15 C). Die maximale gemessene Transfektionseffizienz war geringer als in CHO-Zellen mit 42% in HEK-293 und 26% in Jurkat-Zellen. Dies entspricht der Erwartung, da alle drei Zelllinien nach demselben Protokoll transfiziert wurden, welches für die Transfektion von adhärennten CHO-Zellen etabliert und optimiert wurde. Um eine höhere Transfektionseffizienz zu erreichen wäre es besonders für Jurkat Zellen notwendig ein Protokoll für Suspensionszellen zu etablieren, da diese schwieriger zu transfizieren sind und empfindlich auf die Zugabe von toxischen Polymeren reagieren.⁸³

Um den Einfluss der untersuchten Transfektionsparameter N/P-Verhältnis, zugegebene Menge an Polymer und zugegebene Menge an pDNA statistisch weiter zu untersuchen, wurden aus den Messdaten mit R (R Development Core Team, Version 3.1.2) die jeweiligen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman erstellt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz/Viabilität und N/P-Verhältnis sowie zugegebene Menge an pDNA und Polymer.

Gezeigt sind die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und die zugehörigen Signifikanz-Niveaus. P-Werte von $> 0,05$ wurden rot und kursiv markiert.

Zelllinie		Transfektionseffizienz	Viabilität
CHO-K1	DNA	0,450 ($p < 0,05$)	- 0,527 ($p < 0,05$)
	Polymer	0,834 ($p < 0,05$)	- 0,923 ($p < 0,05$)
	N/P Ratio	0,662 ($p < 0,05$)	- 0,697 ($p < 0,05$)
HEK-293	DNA	0,350 ($p < 0,05$)	- 0,466 ($p < 0,05$)
	Polymer	0,778 ($p < 0,05$)	- 0,656 ($p < 0,05$)
	N/P Ratio	0,601 ($p < 0,05$)	- 0,436 ($p < 0,05$)
Jurkat	DNA	<i>0,113 ($p = 0,604$)</i>	<i>- 0,221 ($p = 0,308$)</i>
	Polymer	0,809 ($p < 0,05$)	- 0,763 ($p < 0,05$)
	N/P Ratio	0,630 ($p < 0,05$)	- 0,471 ($p < 0,05$)

In allen untersuchten Zelllinien zeigte die Transfektionseffizienz eine statistisch signifikante starke Korrelation mit der Polymermenge. Eine Korrelation mit dem N/P-Verhältnis war ebenfalls vorhanden, wenn auch weniger stark ausgeprägt, wohingegen keine signifikante Korrelation zwischen der DNA-Konzentration und der Transfektionseffizienz gefunden wurde. Bei den Viabilitäten wurde eine negative Korrelation mit allen drei Parametern beobachtet, auch wenn diese im Falle der DNA Menge in Jurkat Zellen nicht statistisch signifikant war. Zwischen den untersuchten Parametern hatte die Polymermenge den stärksten Einfluss auf die Viabilitäten, gefolgt vom N/P-Verhältnis und schließlich der DNA-Konzentration.

Die Ergebnisse im Gesamten implizieren, dass der etablierte Weg die N/P-Verhältnisse der Transfektionsprotokolle über die DNA-Menge anzupassen möglicherweise nochmals überprüft werden muss. Insbesondere für stark toxische Polymere könnte es sich als vorteilhaft erweisen zunächst die Mindestmenge an notwendigem Polymer für eine effiziente Transfektion über einen breiten Polymer-Konzentrationsbereich zu bestimmen und die weitere Optimierung in einem zweiten Schritt über Anpassung der pDNA-Konzentration vorzunehmen. Da üblicherweise die freien polykationischen Polymere als toxischer als die zugehörigen Polyplexe^{16,156} gelten, könnte auf diese Weise der Überschuss an freiem Polymer so gering wie möglich gehalten werden, ohne zugleich die Transfektionseffizienz zu beeinträchtigen.

3.2.3 Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Magnetismus

Bei den meisten kationischen Polymeren, die zur Transfektion verwendet werden, handelt es sich um lineare Polymere wie beispielsweise L-PEI, PDMAEMA, PLL (Poly-L-Lysin) und viele weitere, die auch in verzweigter bis sternförmiger Struktur synthetisiert werden können.⁹ Was die Nanosterne, die in dieser Arbeit untersucht werden, von den üblichen polykationischen Transfektionsagenzien unterscheidet, ist der solide Maghemitkern ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Dieser ist superparamagnetisch und es wurde gezeigt, dass nicht nur die gebildeten Polyplexe, sondern auch damit behandelte Zellen magnetisch wurden.^{70,157} Die Möglichkeit, Polyplexe und transfizierte Zellen durch die Anwendung von magnetischen Feldern zu beeinflussen könnte neue Einsatzfelder ermöglichen, beispielsweise im medizinischen Bereich.⁶⁶

Um den Magnetismus bei der Transfektion mit den Nanosternen näher zu untersuchen, wurde ein 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gestell für Eppendorf

Gefäße, in dessen Zwischenwand 8 starke Magneten eingebracht sind (Abbildung 16).

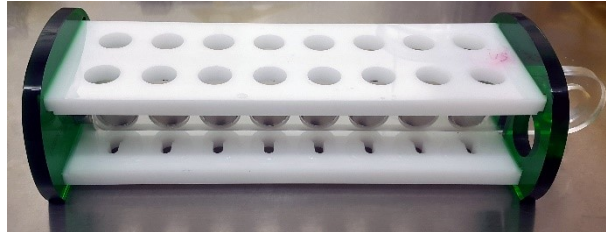


Abbildung 16: Magnetic rack zur Analyse der magnetischen Zellfraktion

Verwendetes Modell: 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack (Bio-Rad, München, Deutschland)

Dieses wird normalerweise für Anwendungen wie Immunpräzipitation oder Protein Pull-Down Assays verwendet. Es war daher notwendig, zunächst ein Protokoll zu etablieren, da der Magnetismus von magnetischen Zellen oder Polyplexen längst nicht so stark ist, wie beispielsweise von Antikörper-markierten Magnetic Beads im Rahmen einer Immunpräzipitation, welches die Separierung innerhalb von Minuten ermöglicht. In Vortests hat sich gezeigt, dass unbehandelte Kontrollzellen verhältnismäßig lange zur Sedimentation brauchen, nach 2h waren immer noch 25% in Suspension. Bei der Inkubation über Nacht im Kühlschrank waren schließlich 95% der Zellen sedimentiert mit einer Viabilität von > 90% im Trypanblau Test. Daher wurde die über Nacht Inkubation in das finale Protokoll übernommen: Zunächst wurden die transfizierten Zellen geerntet und jeweils in serumfreiem Kulturmedium gesammelt, in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt, diese in das Magnetic Rack gestellt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand und die sedimentierten Zellen gesammelt, die magnetische Zellfraktion befand sich am Gefäßrand der zum Magneten zugewandten Seite und wurde gewonnen, indem das Eppendorf Gefäß aus dem Magnetfeld entfernt wurde. Die Zellen beider Fraktion wurden schließlich per Vi-Cell gezählt und daraus die prozentualen Anteile berechnet.

3.2.3.1 Vergleich der verschiedenen Nanosterne

Für einen umfassenden und systematischen Vergleich der verschiedenen Nanosterne (Tabelle 1) untereinander wurden jeweils Polyplexe aus Nanostern und pEGFP-N1 gebildet und damit CHO-K1 Zellen bei den gleichen N/P-Verhältnissen transfiziert. Dies ermöglicht eine Untersuchung des Einflusses der Struktur und Aufbau der Nanosterne auf das Ergebnis der Transfektion. Des Weiteren wurde zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen für die Analyse der Transfektionseffizienz im FACS (26 h nach Polyplex Zugabe) jeweils ein Aliquot von $\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen entnommen und der Anteil an magnetischen Zellen mittels magnetic rack (siehe Kapitel 3.2.3) bestimmt. Der Nanostern NS4 konnte für diesen Vergleich nicht berücksichtigt werden, da von diesem nur eine kleine Charge synthetisiert wurde und daher zu diesem Zeitpunkt keine ausreichende Menge mehr zur Verfügung stand. Abbildung 17 fasst die Transfektionseffizienzen, Viabilitäten und den Anteil an magnetischen Zellen zusammen.

Dabei zeigte sich, dass die Transfektionseffizienzen und der Anteil magnetischer Zellen mit dem N/P-Verhältnis stiegen, wohingegen die Viabilitäten abnahmen. Während der Trend der abnehmenden Viabilität bei allen untersuchten Nanosternen beobachtet wurde, war die Abnahme selbst in den meisten Fällen gering beziehungsweise von keiner statistischen Signifikanz in manchen Fällen. Die Ursache für die Zunahme der Zytotoxizität bei höheren N/P-Verhältnissen wird üblicherweise der ansteigenden Menge an überschüssigem polykationischem Polymer in Transfektionsmix zugeschrieben.²² Freie Polymerketten fördern die Internalisierung und unterstützen die Transfektion, destabilisieren aber gleichzeitig die Plasmamembran, was zu einer toxischen Wirkung führen kann.^{156,155}

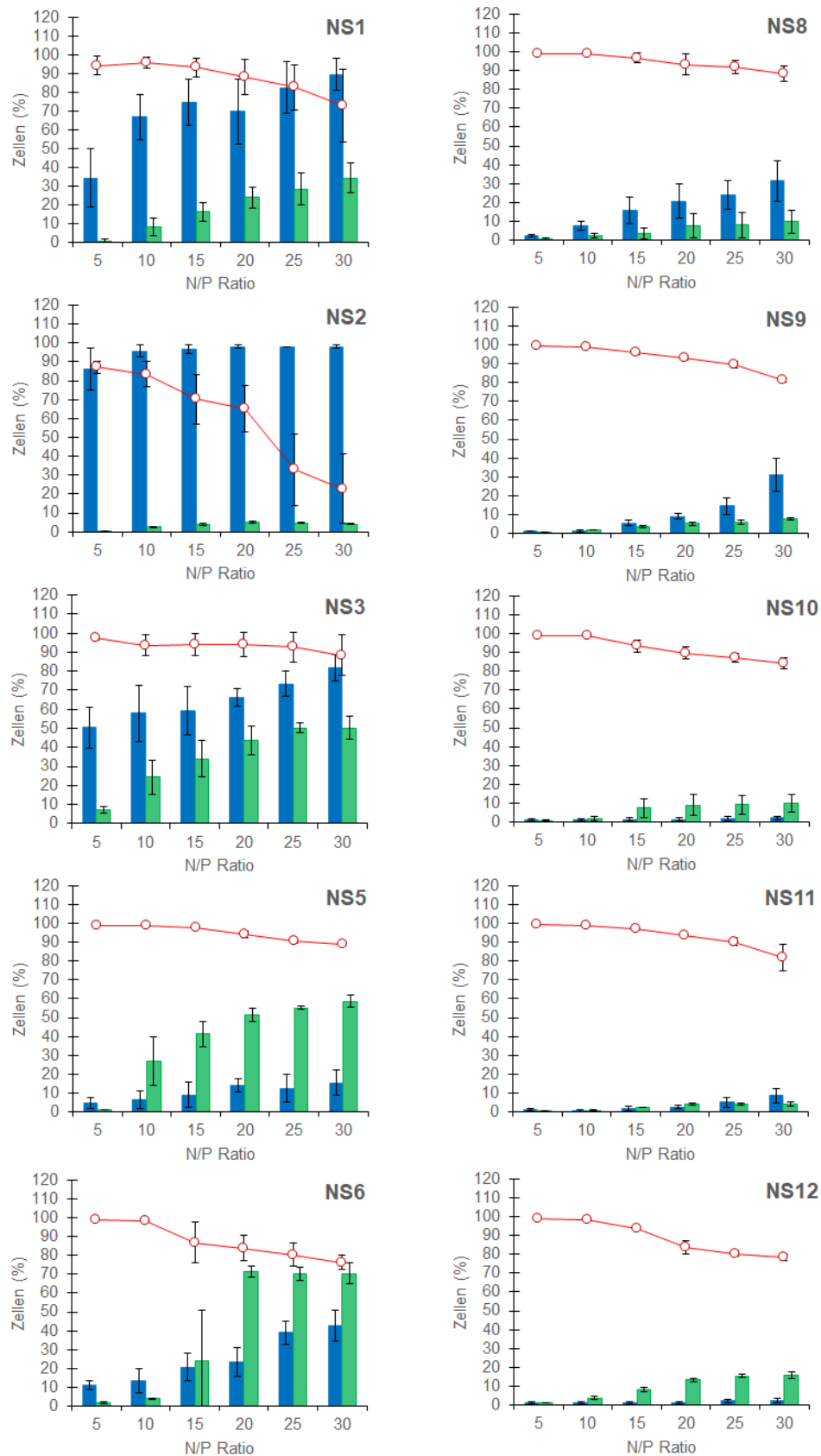


Abbildung 17: Transfektionseffizienzen (■), magnetische Zellfraktionen (■) und Viabilitäten (—○) 26 h nach der Transfektion
Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$.

Die beobachteten Trends als Funktion der Polymerarchitektur, insbesondere der Armdichte, sind weniger offensichtlich. Der deutlichste Trend wird bei der Fraktion an magnetischen Zellen offenbar, deren Anteil mit zunehmender Armdichte abnahm. Es war jedoch nicht klar, ob die Zellen die Nanosterne beziehungsweise die Polyplexe tatsächlich aufnehmen müssen um magnetisch zu werden. Es erscheint ebenfalls möglich, dass ein Teil der Polyplexe lediglich an das Äußere der Zellen bindet ohne Endozytose beziehungsweise zelluläre Aufnahme zu bewirken. Dieses Phänomen ist auch für andere Eisenoxid-Nanopartikel beschrieben und kann beispielsweise zu Fehleinschätzungen des Dosiseffekts bei therapeutischer Anwendung wie MRI führen, wenn extrazelluläre Aggregationen, die nicht von der Zelle aufgenommen werden, die Messung verfälschen.¹¹⁴ Üblicherweise ist die unspezifische Adsorption von positiv geladenen Polyplexen an die negativ geladene Plasmamembran bei einer Transfektion erwünscht, da es die Aufnahme in die Zelle erhöht, sofern die Komplexe nicht zu groß sind.^{37,158}

Da einfache Bindung an die Zellen für die großen Polyplexe wahrscheinlicher sein sollte, erscheint es in diesem Kontext interessant, dass die Nanosterne, welche Komplexe mit besonders großen hydrodynamischen Radien bildeten (NS1 und NS2; vergleiche 2.2.2, Abbildung 5), in einem unverhältnismäßig großen Anteil von magnetischen Zellen bei gleichzeitig eher geringer Transfektionseffizienz resultierten. Die optimale Transfektionseffizienz war generell eine Funktion der Armdichte. Nanosterne mit Armdichten zwischen 0,024 Ketten/nm² (NS3) und 0,064 Ketten/nm² (NS6) zeigten die besten Ergebnisse. Der höchste individuelle Wert wurde für NS6 (71 ± 3% EGFP-positive Zellen) bei N/P ≥ 20 bestimmt. Die schwächere Transfektionseffizienz der Nanosterne mit niedrigerer Armdichte (NS1 und NS2) kann durch die beträchtliche Größe der dazugehörigen Polyplexe erklärt werden, welche die zelluläre Aufnahme durch Endozytose behindern, da die Größe der Komplexe einer der wichtigsten Faktoren darstellt und maßgeblich den Aufnahmeweg beeinflusst.¹⁵⁹ Als Richtwert gilt, dass Nanopartikel für eine effiziente

Aufnahme in die Zelle eine Größe von 500 nm nicht überschreiten sollten.¹⁴⁷ Zu große Polyplexe kann jedoch nicht im Falle der Nanosterne mit einer sehr hohen Armdichte die Ursache für die geringe Transfektionseffizienz darstellen. Eine Erhöhung der Zytotoxizität als Ursache für die geringe Transfektionseffizienz war ebenfalls unwahrscheinlich, da nur eine schwache Verringerung der Viabilitäten für die verschiedenen Nanosterne beobachtet wurde. Wie schon in Kapitel 2.2.4 besprochen, könnte für die geringere Transfektionseffizienz der Nanosterne mit sehr hohen Armdichten die Polyplex-Stabilität verantwortlich sein, welche bei hohen Armdichten verringert war. Wenn die pDNA-Polykation-Komplexe nicht stabil genug sind, kann es zu einer frühzeitigen Freisetzung der pDNA kommen, wodurch diese im ungünstigsten Fall vor Erreichen des Zellkerns durch Nukleasen abgebaut würde.¹⁰³

Es wurde schon von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel („SPIONs“) abhängig von der untersuchten Zelllinie teils erhebliche zytotoxische Effekte zeigen können.¹⁶⁰ Daher existieren mittlerweile viele Strategien, SPIONs mit unterschiedlichen Materialien zu beschichten, um beispielsweise die Zytotoxizität zu verringern oder die Aufnahme durch die Zellen zu verbessern.^{161–163} Dabei zeigten selbst SPIONs, welche mit Polymeren wie PDMA (Poly(N,N-dimethylacrylamid) funktionalisiert wurden, welches selbst über eine inhärente Zytotoxizität verfügt, eine verringerte Zytotoxizität gegenüber den nackten Nanopartikeln.¹⁶⁴ Der Eisenoxid-Kern der Nanosterne wurde noch mit einer Silica-Hülle beschichtet um die kovalente Modifikation mit den PDMAEMA-Armen zu ermöglichen. Bislang ist nur wenig bekannt über die Zytotoxizität von Silica-beschichteten SPIONs, noch über die Haltbarkeit oder Widerstandsfähigkeit dieser Beschichtung, sobald sie in den Kontakt mit lebenden Organismen kommt. Es ist also denkbar, dass die beobachtete Verringerung der Viabilitäten bei den Nanosternen mit der geringen Armzahl an der toxischen Wirkung des Eisenoxidkerns selbst liegt, welcher bei den Nanosternen mit

einer dichteren PDMAEMA Korona weniger exponiert wird. Darüber hinaus zeigten die Nanosterne mit geringer Armzahl in DLS-Messungen eine Tendenz zur Aggregationsbildung (siehe Abbildung 5), was ebenfalls die Zytotoxizität erhöhen kann.

3.2.3.2 Einfluss der Interaktionszeit

Die erste Barriere, welche die Polyplexe zur erfolgreichen Transfektion überwinden müssen, ist die Aufnahme in die Zelle und damit die Zellmembran.^{28,165–167} Die Aufnahme geschieht über einen biologischen Prozess (Endozytose) und ist daher einer Kinetik unterworfen. Werden die Polyplexe zu den Zellen gegeben, wird üblicherweise nach einer gewissen Zeit das Transfektionsmedium durch Kulturmedium ersetzt, um die freien in Suspension befindlichen Polyplexe zu entfernen, um die zytotoxischen Auswirkungen durch die Transfektionsagenzien zu reduzieren. In vielen Transfektionsprotokollen beträgt die Inkubationsdauer zwischen Polyplexzugabe und Medientausch 180 – 240 Minuten.¹⁴² Daher wurde bei der Etablierung des Transfektionsprotokolls (Siehe Kapitel 1.5) eine Inkubationsdauer von 240 min übernommen. Es ist jedoch nicht bekannt, wie schnell die Aufnahme der Nanosterne durch die Zellen erfolgt. Im Folgenden sollen der Einfluss der Interaktionszeit auf die Transfektionseffizienz und die Zahl magnetischer Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Polyplexe aus NS5 und pEGFP-N1 bei einem N/P-Verhältnis von 15 gebildet, diese zu den Zellen gegeben und in den jeweiligen Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten das Transfektionsmedium mit den freien Polyplexen durch frisches Kulturmedium ausgetauscht. Nach 26 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die Transfektionseffizienz sowie der Anteil an magnetischen Zellen bestimmt (Abbildung 18).

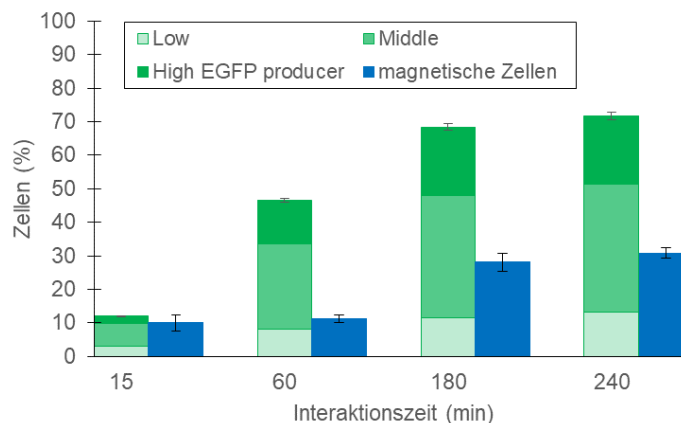


Abbildung 18: Einfluss der Kontaktzeit zwischen Zellen und Polyplexen/Nanosternen auf die Transgenexpression und die magnetischen Zellfraktionen

Zellen wurde mit NS5 (N/P = 15) transfiziert. 240 min entsprechen der Inkubationszeit des Standard Transfektionsprotokolls. Die Daten repräsentieren ein als Triplikat gemessenes Experiment. \pm SD. Die Viabilität war bei allen Proben > 95%.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigten Zellen, die mit NS5 transfiziert wurden, eine deutliche Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Inkubationsdauer mit den Polyplexen. Die maximale Transfektionseffizienz von 70% wurde ab einer Kontaktzeit von 180 min erreicht, eine längere Inkubation für insgesamt 240 min führte nicht zu einer Erhöhung des Anteils an EGFP-positiven Zellen. Die Verteilung von „low“- , „middle“- und „High“-Producern war dabei vergleichbar. Auch die Zahl an magnetischen Zellen korrelierte mit der Kontaktdauer bis 180 min, danach folgte keine weitere Erhöhung und es blieb bei einem Anteil von 30% magnetischer Zellen.

Diese Daten suggerieren, dass der überwiegende Teil der Polyplex-Aufnahme bereits nach 180 min abgeschlossen ist und eine längere Kontaktzeit keine Verbesserung der Transfektion bewirkt. Die Polyplexe wurden relativ schnell von den Zellen aufgenommen, eine Kontaktzeit von 15 min führte zu jeweils 10% EGFP-positiver und magnetischer Zellen. Dabei zeigte sich, dass mit einer längeren Kontaktzeit über 15 min hinaus die Transfektionseffizienz deutlich stärker anstieg als der Magnetismus. Es ist denkbar, dass verschiedene Mechanismen während der

Inkubation zum Tragen kommen, welche die Abhängigkeit von der Kontaktzeit erklären. Bei der Transfektion von adhären Zellen handelt es sich bei der Sedimentation der Nanopartikel auf die Zellen um einen zeitabhängigen Prozess, welcher im Falle der Nanosterne nach 60 min möglicherweise noch nicht voll abgeschlossen ist.¹⁶⁸ Schweiger et al. (2012)¹⁶⁹ haben für verschiedene SPIONs gezeigt, dass je nach Polymerbeschichtung die Aufnahme des Großteils der Nanopartikel zwischen 15 min und 8 h variieren kann. Dazu kommt, dass nicht bekannt ist, wie viele pDNA Moleküle im Kern ankommen müssen, damit die EFGP-Expression hoch genug ist um bei der Messung als positiv transfizierte Zelle gewertet zu werden. Es ist daher denkbar, dass ein Teil der Zellen nach 60 min Inkubationszeit noch nicht den nötigen Schwellenwert erreicht hatte, um im Durchflusszytometer als positiv transfizierte Zelle detektiert zu werden.

3.2.3.3 Einfluss der Inkubationsdauer

In Kapitel 3.2.3.2 wurde gezeigt, welchen Einfluss die Dauer der Interaktionszeit zwischen Polyplexen und Zellen hatte. Eine weitere Einflussgröße des Transfektionsprotokolls stellt die Inkubationszeit dar. Das etablierte Transfektionsprotokoll für die Nanosterne sieht die Bestimmung der Transfektionseffizienz ~ 26 h nach Polyplex Zugabe vor. Im Folgenden soll daher untersucht werden, wie sich eine Inkubationszeit über 26 h hinaus auf die Transfektionseffizienz, Magnetismus und Viabilität auswirkt. Dabei wurden drei verschiedene Ansätze gewählt: Im ersten Ansatz wurden zu den CHO-K1 Zellen Polyplexe aus pEGFP-N1 und dem Nanostern NS5 bei N/P = 30 gegeben. In den beiden anderen Ansätze wurde zu den Zellen entweder nur pDNA oder nur Nanosterne (einer N/P = 30 entsprechenden Konzentration) gegeben. Das Transfektionsmedium wurde gemäß den Standardbedingungen nach 4h

ausgetauscht und die Zellen wurden anschließend für 26 – 76 h weiter inkubiert (Abbildung 19).

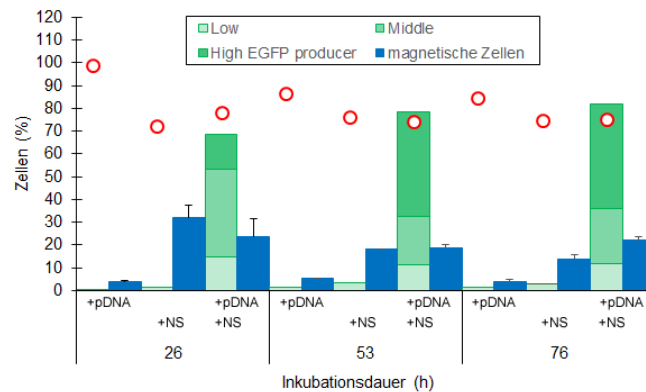


Abbildung 19: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Transfektionseffizienz und den Magnetismus

Es wurden CHO-K1 Zellen mit NS5 (N/P = 30) transfiziert und jeweils nach 26h, 53h oder 76h die Transfektionseffizienz (■), Viabilität (○) sowie den Anteil magnetischer Zellen (■) bestimmt. Zu den Zellen wurden entweder die gebildeten Polyplexe aus NS5 und EGFP-N1 (+pDNA +NS5), nur Plasmid DNA (+pDNA) oder nur Nanosterne (+NS) gegeben. Die Daten repräsentieren ein als Duplikat gemessenes Experiment. ± SD.

In den Ansätzen der Polyplexzugabe wurde nach 26 h eine Transfektionseffizienz von ~ 70% gemessen, nach 53 h waren es 80%. Dabei nahm nicht nur die gesamte Transfektionseffizienz zu, sondern auch der Anteil an EGFP High Producern stieg von 16% auf 45%. Nach der Inkubation um weitere 23 h war die Transfektionseffizienz noch immer bei 80% mit einer vergleichbaren Verteilung von Low-, Middle- und High-Producern. Erwartungsgemäß wurde keine Transfektionseffizienz bei reiner pDNA Zugabe gemessen, da diese ohne Vektor die Biomembran nicht überwinden kann, beziehungsweise falls eine Aufnahme erfolgt, die pDNA degradiert wird, bevor sie den Zellkern erreicht.^{2,3,170} Ebenso ist keine Transfektionseffizienz bei reiner Nanosternzugabe zu erwarten, da ohne Transgen

keine EGFP-Expression stattfinden kann, was experimentell bestätigt wurde. Beim Magnetismus dagegen war der Einfluss der Inkubationsdauer weniger deutlich. Von den Zellen, zu denen Polyplexe gegeben wurden, waren nach 26 h Inkubationsdauer $23 \pm 8 \%$ magnetisch. Der Anteil magnetischer Zellen blieb trotz längerer Inkubationszeit verhältnismäßig stabil: Nach 53 h waren noch $19 \pm 2 \%$ magnetisch, nach 76 h betrug der Anteil $22 \pm 2 \%$. In den Ansätzen, bei denen nur Nanosterne zu den Zellen gegeben wurden, war ebenfalls ein bedeutender Teil der Zellen magnetisch: So waren zum Zeitpunkt von 26h ein Anteil von $32 \pm 6 \%$ magnetisch, welcher auf 18% (53 h) beziehungsweise $14 \pm 2\%$ (76 h) absank.

Die Nanosterne mit ihrem Überschuss an positiven Ladungen können an die negativ geladenen Proteoglykane an der Außenseite der Zellen binden und auf diese Weise über unspezifische adsorptive Endozytose aufgenommen werden.^{158,171} Es kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, ob die Internalisierung der Nanosterne für die magnetische Eigenschaft der Zellen notwendig ist oder ob bereits eine Bindung an die Zelle in ausreichender Zahl genügt. Nach 76h Inkubationsdauer haben die Zellen mindestens drei Durchgänge des Zellzyklus durchlaufen.¹⁷² Interessant ist, dass dennoch kein Verdünnungseffekt beim Anteil an magnetischen Zellen zu beobachten ist. Berücksichtigt man die Teilungsrate der Zellen, wäre eine wesentlich stärkere Abnahme des Magnetismus zu erwarten. Daher ist denkbar, dass bei der Zellteilung eine annähernd gleichmäßige Verteilung der Nanosterne auf die Tochterzellen erfolgt.

Es wurden bereits verschiedene Biodegradationsprozesse im Zusammenhang mit SPIONS beschrieben. Da die meisten Nanopartikel eingeschlossen in intrazellulären Kompartimenten enden, wird angenommen, dass die Prozesse der Biotransformation dort stattfinden.^{173–175} Der saure pH der Lysosomen ($\sim \text{pH } 4,7$), die Verdauungsenzyme und die Eisenchelatoren des Eisenstoffwechsels der Zelle könnten zum Abbau der Nanopartikel beitragen.¹⁷⁶ Der vollständige Prozess der

Biodegradation kann Monate dauern, wobei das Eisen schließlich in Ferritin-Speicherproteinen eingebaut wird.¹⁷⁷

Im Falle der Nanosterne blieb der Magnetismus über 72 h hin beinahe unverändert, was darauf hindeutet, dass sowohl die Biodegradation als auch der Transport der Nanosterne aus der Zelle bis zu diesem Zeitpunkt nur eingeschränkt stattfand. Der Grund hierfür könnte in der Beschichtung der γ -Fe₂O₃ Nanopartikel mit Silica und den aufgelagerten PDMAEMA-Armen liegen, welche die beschriebenen Abbauprozesse erschweren, da die Kinetik der Biodegradation stark von der Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel abhängt.^{146,178} Auch fördert das saure Milieu die Aggregation von Eisenoxid-Nanopartikeln innerhalb der Zelle, was die Biodegradation erschwert und die Beständigkeit des Magnetismus vieler SPIONs erklärt.¹⁷⁸

Falls auch Nanosterne, die an das Äußere der Zellen gebunden haben, zum Magnetismus der Zelle beitragen, so scheint diese Bindung nicht reversibel zu sein, da die Nanosterne beim Ernten der Zellen beziehungsweise beim Medienwechsel ansonsten mit dem Medium entfernt würden. Dies würde sich in einer Verringerung des zellulären Magnetismus zeigen.

3.2.3.4 Transfektionseffizienz und Magnetismus in verschiedenen Zelllinien

Der Transfektionserfolg kann je nach verwendeter Zelllinie unterschiedlich ausfallen, da manche Zellen schwerer zu transfizieren sind als andere.^{83,158} In Kapitel 3.2.3.3 wurden nicht nur Polyplexe, sondern auch in separaten Ansätzen entweder nur Nanosterne oder nur pDNA zu den Zellen gegeben. Im Folgenden wird mit diesem Ansatz nun untersucht, wie sich bei gleicher Inkubationsdauer die Transfektionseffizienz und der Magnetismus in verschiedenen Zelllinien verhält.

Hierfür wurden die drei adhärenen Zelllinien CHO-K1, HEK-293 und L929 ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 zusammengefasst.

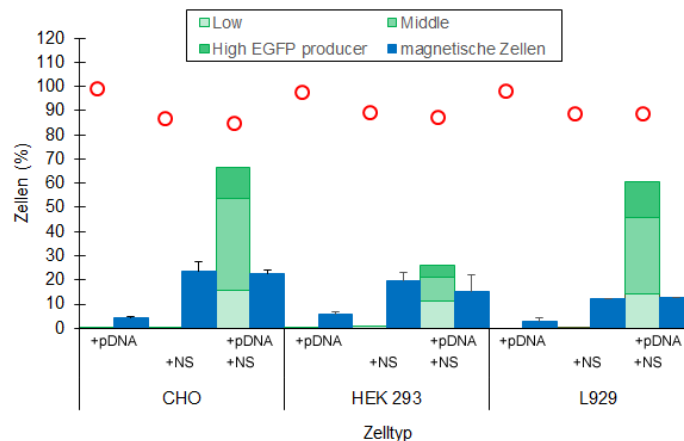


Abbildung 20: Transfektionseffizienz und Magnetismus in verschiedenen Zelllinien

Es wurden adhärenen CHO-K1, HEK-293 und L929 Zellen mit NS5 (N/P = 30) transfiziert und nach 25h die Transfektionseffizienz (■), Viabilität (○) sowie den Anteil magnetischer Zellen (■) bestimmt. In beiden Experimenten wurden zu den Zellen entweder die gebildeten Polyplexe aus NS5 und EGFP-N1 (+pDNA +NS), nur Plasmid DNA (+pDNA) oder nur Nanosterne (+NS) gegeben. Die Daten repräsentieren ein als Duplikat gemessenes Experiment. \pm SD.

Die Transfektionseffizienz in CHO und L929 Zellen war auf einem vergleichbaren Niveau mit jeweils 67% beziehungsweise 61% EGFP-positiver Zellen. In HEK-Zellen wurde eine Transfektionseffizienz von 26% erreicht. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass alle drei Zelllinien für bessere Vergleichbarkeit nach demselben Protokoll transfiziert wurden, welches ursprünglich für die Transfektion von CHO-Zellen optimiert wurde. Dass mit diesem Protokoll eine vergleichbare Transfektionseffizienz auch in L929-Zellen (Kapitel 3.2.1.3) erreicht werden kann, beziehungsweise die Transfektion in HEK-293 Zellen (Kapitel 3.2.2) geringer ausfällt wurde bereits gezeigt. Da HEK-293 Zellen generell als eine für Transfektion gut

geeignete Zelllinie gelten, erscheint eine Adaption des Transfektionsprotokolls notwendig. Auch beim Magnetismus zeigte sich ein, wenn auch etwas geringerer, Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien. Nach 25h Inkubationsdauer waren wiederum 23 ± 1 % der CHO-Zellen magnetisch, etwas mehr als bei den Ansätzen mit den HEK- (15 ± 7 %) oder den L929-Zellen (13 %). Wie schon in den CHO-Zellen des vorherigen Experiments (siehe Kapitel 3.2.3.4) führte die Zugabe von reinen Nanosternen zu einem vergleichbaren Anteil an magnetischen Zellen, auch in HEK und L929 Zellen (Abbildung 20).

Auch an dieser Stelle bestätigte sich die Beobachtung aus den vorherigen Experimenten, dass Magnetismus und Transfektionseffizienz nicht direkt zusammenhängen. Besonders deutlich wird es, wenn man das Transfektionsergebnis der CHO- und HEK-Zellen vergleicht. Obwohl die Transfektion in beiden Zelllinien zu einem annähernd gleichen Anteil magnetischer Zellen führte, war die relative Transfektionseffizienz in HEK-Zellen 60% geringer als in CHO-Zellen. Für eine positive Transfektion müssen eine Vielzahl an zellulären Barrieren überwunden werden: So spielt nicht nur die zelluläre Aufnahme eine Rolle, sondern unter anderem auch die Befreiung aus den Endosomen, der Schutz vor Nukleasen, die Trennung von pDNA und Vektor (und damit die Komplex-Stabilität) und der pDNA-Transport in den Kern.³⁸ Während der genaue Mechanismus, der zur Entstehung der magnetischen Zellen führt, noch unbekannt ist, liegt jedoch die Hypothese nahe, dass die Bindung an die Zellmembran und / oder die Aufnahme der Nanosterne die magnetische Abtrennung der Zellen bereits ermöglicht, vorausgesetzt es liegt die dafür notwendige Konzentration Nanosterne vor. Bemerkenswert ist der geringe Unterschied des Anteils magnetischer Zellen in den verschiedenen Zelllinien, da sich verschiedene Zelltypen teils erheblich unterscheiden können in den Aufnahmewegen, der Zusammensetzung der Biomembran und damit der Konzentration an Oberflächenproteinen, Proteoglykanen auf der Außenseite der Biomembran und vieles mehr. Beispielsweise beeinflussen

der Cholesterolgehalt der Zellmembran und die Lipid Rafts die Aufnahme in die Zelle.¹⁷⁹ Die unterschiedliche Verteilung der Proteoglykane könnte erklären, warum manche Zelllinien einfacher zu transfizieren sind als andere.¹⁵⁸

3.2.3.5 Magnetische Abtrennung und anschließende Kultivierung

Ein interessantes Alleinstellungsmerkmal von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln („SPIONs“) bietet die magnetische Zellsortierung, mit deren Hilfe gezielt bestimmte Zell(typen) aus einer heterogenen Population isoliert werden können. Hierfür werden häufig an Eisenpartikel gebundene Antikörper verwendet.¹⁸⁰ Eine interessante neue Möglichkeit könnte die Kombination von Transfektion und magnetischer Sortierung bieten. Dafür wäre ein System notwendig, das schonend genug zu den Zellen ist und die Viabilität nicht zu stark beeinträchtigt, sowie eine sterile Abtrennung der transfizierten Zellen ermöglicht. Daher wurde eine Alternative zu der Behandlung mittels des „Magnetic Rack“ (siehe Abbildung 16) entwickelt. Für diesen Zweck wurde ein Protokoll für das MACS-System (**M**agnetic **A**ctivated **C**ell **S**orting; Miltenyi Biotec) adaptiert, welches ursprünglich für die Antikörper-basierte magnetische Zellabtrennung vorgesehen ist.¹⁸¹ Dieses System basiert auf einer mit ferromagnetischen Kügelchen gefüllten Säule, welche die magnetischen Zellen zurückhält, wenn ein Magnetfeld angelegt wird. Die nicht-magnetischen Zellen können im darauf folgenden Waschschrift im Durchfluss gesammelt werden. Entfernt man anschließend die Säule aus dem Magnetfeld, werden die magnetischen Zellen nicht länger zurückgehalten und können „eluiert“ werden (Abbildung 21).

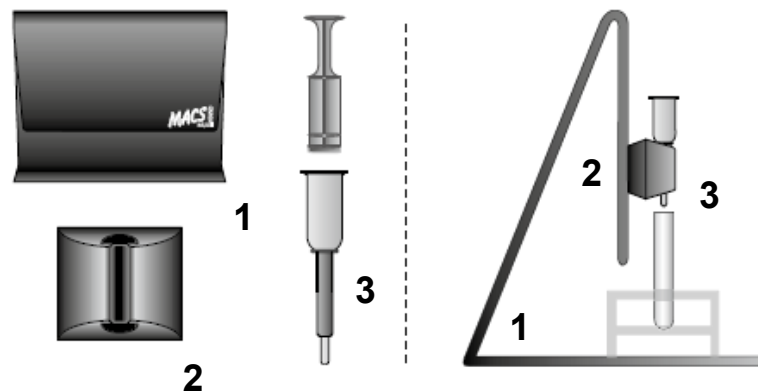


Abbildung 21: Multistand Apparatur (1) mit MidiMACS Separator (2) und LS Column (3).

Abbildung nach © Miltenyi Biotec, 2013; modifiziert

Die Vorteile gegenüber dem „magnetic rack“ bestehen vor allem in der Zeitersparnis, wodurch die Abtrennung der Zellen nach dem Herstellerprotokoll nach ungefähr 60 min abgeschlossen ist. Der zeitaufwändige Schritt mit der Über-Nacht-Inkubation beim „magnetic rack“ Protokoll entfällt damit (siehe Kapitel 3.2.3).

Zunächst wurde eine Testabtrennung mit unbehandelten CHO-K1 Kontrollzellen durchgeführt. Dabei wurden je drei verschiedene Zellkonzentrationen verwendet, um zu untersuchen, ob die Zellzahl einen Einfluss auf die Elution hat. Das Ziel war dabei zu untersuchen, wie hoch beispielsweise bei einer zu geringen Zellzahl der in der Säule verbleibende Teil der Zellen ist oder ob bei einer zu hohen Zellzahl die Elution beeinträchtigt wird (Abbildung 22).

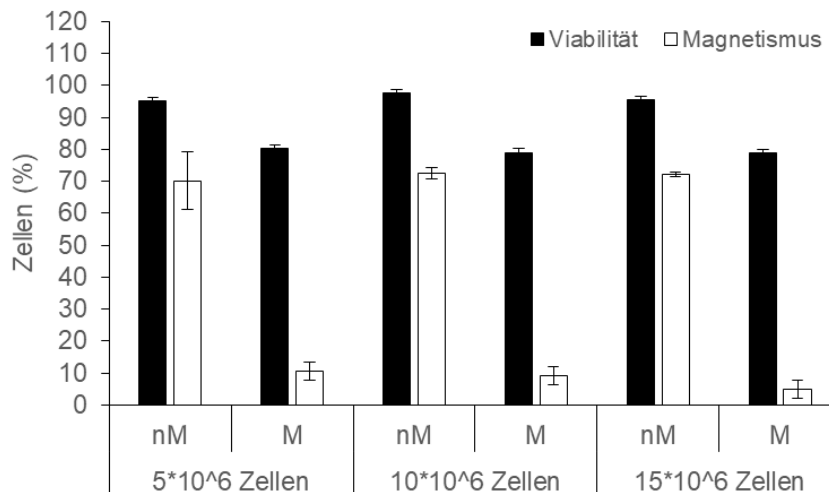


Abbildung 22: Magnetische Testabtrennung per MACS von nicht-transfizierten Zellen

CHO-K1 Zellen wurden geerntet und in verschiedenen Konzentrationen per MACS magnetisch abgetrennt. Die Bestimmung der Viabilität und die Auszählung der verschiedenen Zellfraktionen erfolgten per Vi-Cell Cell Counter. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n = 2$.

Dabei zeigte sich unabhängig von der verwendeten Zellzahl, dass im Mittel $\sim 8\%$ der Zellen als falsch-positiv in der magnetischen Fraktion resultierten. Die Viabilität dieser Zellen war um $\sim 15\%$ vermindert gegenüber den Zellen der nicht-magnetischen Fraktion. Der Grund hierfür könnte am zusätzlichen Schritt der Eluierung liegen, bei welchem der Stöpsel aufgebracht wird um die verbleibenden Zellen mit Druck aus der Säule zu befördern. Auffällig ist, dass durchweg $\sim 20\%$ der Zellen verloren beziehungsweise nicht eluiert wurden.

In Kapitel 3.2.3.3 wurde der Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer nach Polyplex-Zugabe und dem zellulären Magnetismus untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil an magnetischen Zellen trotz längerer Inkubation und zwischenzeitlich erfolgter Zellteilung nicht wesentlich abnahm. Da die Charakterisierung mittels „magnetic rack“ erfolgte, wurden die magnetischen und nicht-magnetischen Zellfraktionen, bedingt durch den Schritt der Über-Nacht-

Inkubation im Protokoll, nicht im Durchflusszytometer untersucht. Die magnetische Zellabtrennung über MACS dagegen ermöglicht sowohl eine direkt im Anschluss resultierende Untersuchung im Durchflusszytometer als auch die Rekultivierung der abgetrennten Zellen.

Hierzu wurden CHO-K1 Zellen mit NS5 (N/P = 20) transfiziert und per MACS 24 h später separiert. Die verschiedenen Fraktionen, magnetisch und nicht-magnetisch, wurden nach Separierung wieder in Kultur gebracht. Ein nicht-separiertes Aliquot aus derselben Kultur diente als Kontrolle. Die EGFP-Expression der Zellen aus den beiden Fraktionen wurde mit der von den Kontrollen sowohl direkt nach der Separation als auch 25 und 49 h später verglichen (Abbildung 23).

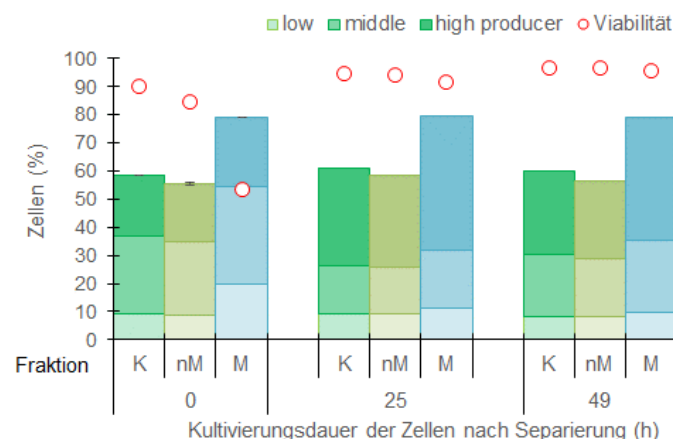


Abbildung 23: EGFP Expression und Anteil magnetischer Zellen nach Zellseparierung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

CHO-K1 Zellen wurden mit NS5 (N/P = 20) transfiziert, nach 24 h in Kultur per MACS separiert ($t = 0$) und getrennt voneinander weiter kultiviert. Dabei waren 72% der Zellen in der nicht-magnetischen und 17% in der magnetischen Fraktion. Dargestellt sind die Zellfraktionen Kontrolle (K, keine Separierung), nicht-magnetisch (nM) und magnetisch (M). Die Daten repräsentieren ein, im Duplikat gemessenes, Experiment. Die Standardabweichung ist eingezeichnet.

Wie auch schon bei der Separierung mit den nicht-transfizierten Zellen (Abbildung 22) wurden ungefähr 20% der Zellen im Laufe der Abtrennung verloren. Dies wurde durch die Beobachtung gestützt, dass die Viabilität der magnetischen Fraktion auf unter 70% direkt nach der Separierung gesunken ist. Nach weiteren 24 h Kultivierung erreichte die Viabilität wieder >90%. Verglichen mit den Kontrollen, waren die EGFP-exprimierenden Zellen durchweg häufiger in der magnetischen Fraktion, während ihr Anteil in der nicht-magnetischen Fraktion etwas geringer war. Darüber hinaus zeigte sich in der Unterteilung der EGFP-exprimierenden Zellen in niedrig-, mittel- und hochproduzierende Zellen (Low-, Middle-, High-Producer) eine geringfügige Verschiebung zu den High-Producern in der magnetischen Zellfraktion.

Als nächstes wurde untersucht, wie sich der Magnetismus und die Transfektionseffizienz verhält, wenn die magnetisch separierten Zellen rekultiviert und einen Tag später erneut aufgetrennt werden. Dies könnte interessante neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen, beispielsweise eine Aufkonzentrierung magnetischer Zellen für MRI (engl. Magnetic Resonance Imaging) oder für die magnetische Hyperthermie-Therapie.⁶⁴ Zu diesem Zweck wurden CHO-K1 Zellen wie zuvor transfiziert (NS5, N/P = 20), kultiviert und anschließend separiert. Die magnetischen und nicht-magnetischen Zellfraktionen, sowie ein nicht-separiertes Aliquot aus derselben Kultur wurden erneut in Kultur gebracht für weitere 22 h. Anschließend wurden alle drei Kulturen ein zweites Mal magnetisch aufgetrennt (Abbildung 24).

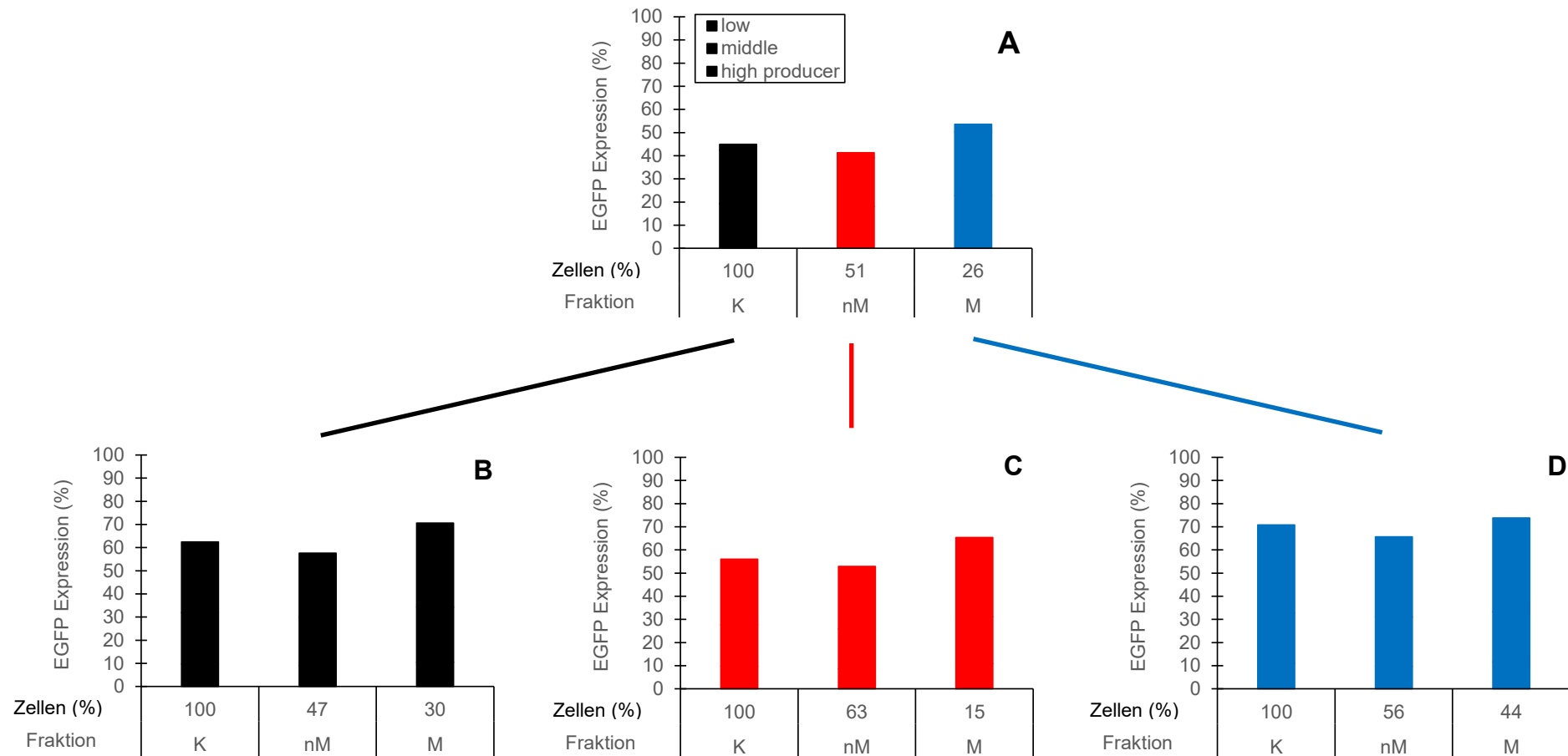


Abbildung 24: EGFP Expression sowie Anteil magnetischer Zellen bei erneuter magnetischer Abtrennung nach Rekultivierung

Die erste Abtrennung (A) erfolgte durch MACS 26 h nach Transfektion (NS5, N/P = 20). Die jeweiligen Fraktionen wurden wieder kultiviert und 22 h später erneut separiert (B, C, D). Dargestellt sind die Zellfraktionen Kontrolle (K, keine Separierung), nicht-magnetisch (nM) und magnetisch (M). Die Daten entstammen aus einem Experiment.

Die erste Separierung ($t = 0$, 26 h nach Transfektion, Abbildung 24 A) ergab ein ähnliches Ergebnis wie zuvor (vergleiche Abbildung 23). Ungefähr die Hälfte der Zellen waren nicht-magnetisch, ~30% magnetisch und wiederum ~20% der Zellen wurden während der Separierung verloren. Die magnetische Zellfraktion zeigte erneut einen geringfügig höheren Anteil von EGFP-exprimierenden Zellen, als die nicht-magnetische Fraktion. Als Zellen aus der nicht-separierten Kontrollkultur 22 h später ein zweites Mal auf die Säule gegeben wurden (also 48 h nach Transfektion), war die relative Verteilung von magnetischen und nicht-magnetischen Zellen erneut ähnlich, während die absoluten Transfektionseffizienzen um ungefähr 10% angestiegen sind (Abbildung 24, B). Der Grund für den Anstieg des Anteils transfizierter Zellen könnte sein, dass nach 22 h noch nicht die maximale Expression des Transgens erreicht war.

Als die magnetisch separierten Kulturen 48 h nach der Transfektion erneut untersucht wurden, zeigte die nicht-magnetische Fraktion von der ersten Separierung (nun „Kontrolle“ in Abbildung 24, C) eine Transfektionseffizienz, die beinahe identisch war zu der nicht-magnetischen Fraktion, die aus der Kontrollkultur während der zweiten Zellseparierung erhalten wurde (Abbildung 24 B). Wurden die nicht-magnetischen Zellen ein zweites Mal magnetisch separiert, wurde eine kleine Fraktion (15%) von magnetischen Zellen erhalten, deren Transfektionseffizienz signifikant höher war als das Aliquot der nicht separierten Zellen (Zellfraktion "Kontrolle", Abbildung 24 C). Die Fraktion der Zellen, die erneut als „nicht-magnetisch“ abgetrennt wurden (63%) zeigten dagegen eine minimal niedrigere Transfektionseffizienz als das nicht-separierte Zellaliquot (Abbildung 24 C). Es kann an dieser Stelle nicht festgestellt werden, warum die Fraktion der magnetischen Zellen nicht schon während der ersten Separierung an die magnetische Säule gebunden hat. Bei der Testabtrennung mit nicht-transfizierten Zellen lag der Anteil an falsch-positiven magnetischen Zellen bei 5 – 10% (Abbildung 22). Es ist daher denkbar, dass beim Waschschrift des MACS-Protokolls ein Teil der eigentlich nicht-magnetischen Zellen in der Säule verbleibt und bei der Elution als falsch-positive "magnetische" Zellen gewonnen werden. Die Korrelation zwischen Magnetismus und Transgen Expression wurde jedoch beibehalten.

Im Falle der Zellen aus der magnetischen Fraktion der ersten Separierung (Abbildung 24 D) waren zwei Beobachtungen besonders auffällig: Erstens war zunächst wenig zusätzlicher Verlust an Zellen während der Abtrennung, beinahe 100% der Zellen wurden wiedergewonnen. Von diesen haben 56% der Zellen ihre magnetischen

Eigenschaften verloren und enthielten auch einen geringeren Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen. Dagegen waren 44% der Zellen erneut magnetisch und zeigten den höchsten Anteil EGFP exprimierender Zellen (> 70% Transfektionseffizienz).

Zwischen dem Moment der Transfektion und der zweiten Zellseparierung 48 h später haben die Zellen im Schnitt bereits zwei Zyklen der Zellteilung durchlaufen.¹⁷² Ungefähr 50% der magnetischen Zellen der ersten Sortierung nach 26 h können daher durch eine Verdünnung während der Zellteilung erklärt werden. Allerdings sollte dann der Anteil an magnetischen Zellen der zweiten Sortierung nach 48 h deutlich geringer sein. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Nanopartikel während der Zellteilung in gleichem Maße auf die Tochterzellen aufgeteilt wurden. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass selbst nach Freisetzung der DNA aus den Polyplexen ausreichende polyanionische Interaktionspartner wie beispielsweise RNA Moleküle oder Proteine im Zytosol zu finden wären, welche damit in der Aufrechterhaltung des zellulären Magnetismus beitragen.

3.2.4 Korrelationsanalyse

Es wurde eine nichtparametrische Spearman Korrelationsanalyse durchgeführt, um zu untersuchen, ob es statistische Zusammenhänge zwischen den molekularen Charakteristiken der Nanosterne (Kerndurchmesser, Armdichte, Armlänge, Zahl an monomeren Einheiten pro Nanostern), den physikochemischen Eigenschaften der zugehörigen Polyplexe (hydrodynamischer Radius, Zetapotential), den Transfektionsbedingungen (N/P-Verhältnis, zugegebene Menge an Polymer) und den zellulären Reaktionen (Transfektionseffizienz, Zahl magnetischer Zellen, Viabilität) gibt. Die Stärke der Korrelation wurde in vier Abstufungen unterteilt: Rho Werte zwischen 0 und 0,25 wurde als keine, 0,25 bis 0,5 als schwache, 0,5 bis 0,75 als mittelstarke und 0,75 bis 1 als starke Korrelation definiert. Zur graphischen Darstellung wurde schließlich noch ein Korrelogramm erstellt (siehe Abbildung 25).

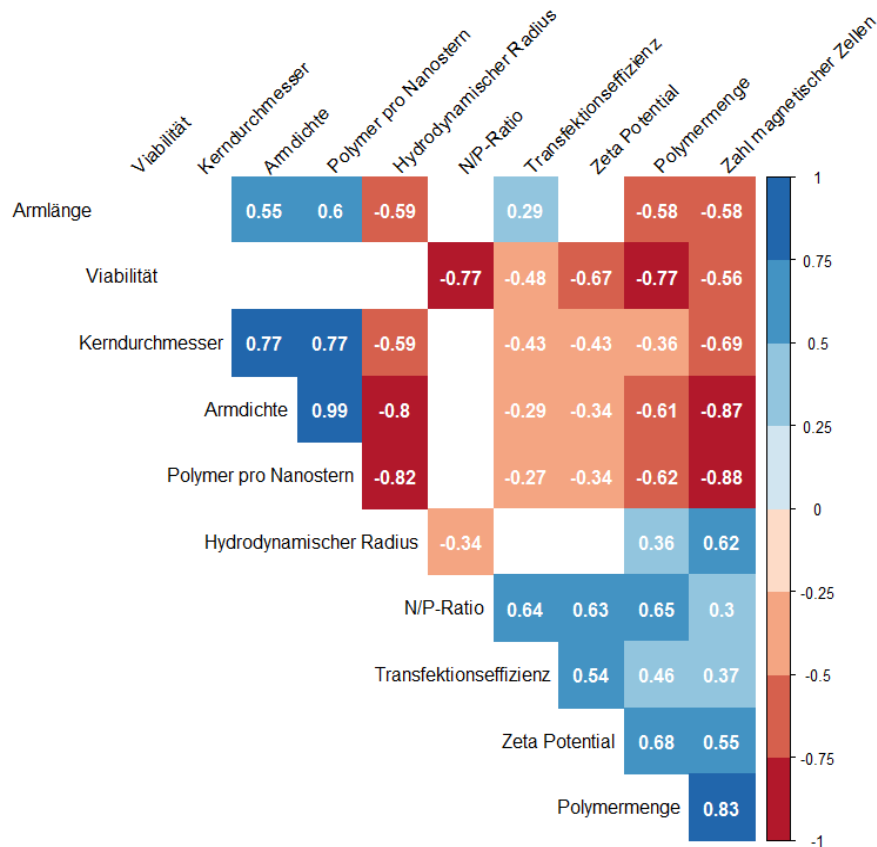


Abbildung 25: Korrelogramm zwischen den Nanostern/Polyplex Charakteristika und den zellulären Antworten (Viabilität, Transfektionseffizienz, Magnetismus)

Es wurden die rho Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet und farblich, sowie als Zahlenwert dargestellt. Die positiven (blau) und negativen (rot) Korrelationen wurden nach Stärke in 4 Abstufungen unterteilt: Keine (0 – 0,25), schwache (0,25 bis 0,5), mittelstarke (0,5 – 0,75) und starke Korrelation (0,75 – 1). Für Parameter, die keine statistisch relevanten Unterschiede zeigten ($p > 0,05$), wurden keine

Innerhalb der zellulären Parameter wurde eine positive Korrelation zwischen Transfektionseffizienz und Magnetismus gefunden, welche beide negativ mit der Viabilität korrelierten. Dabei war keine dieser Korrelationen sehr stark. Eines der Ziele der Durchführung der Korrelationsanalyse war die Identifizierung von (positiven) Korrelationen zwischen Nanostern und/oder Polyplex Charakteristiken und der Transfektionseffizienz, da dies wertvolle Informationen für zukünftige Optimierungen bieten könnte. Abgesehen von einer mittelstarken positiven Korrelation zum N/P-Verhältnis (0,64) und dem Zetapotential (0,54) wurde noch eine schwache positive Korrelation zur Armlänge (0,29) gefunden. Die Zugabe von mehr Polymer für eine vorgegebene Menge an DNA hat ebenfalls der Transfektion geholfen. Allerdings war diese Korrelation nur schwach (0,48) und wurde bereits in vorherigen Experimenten qualitativ untersucht.⁸³

Negative Korrelationen mit der Transfektionseffizienz waren schwach für die Polymermenge pro Nanostern, die Armdichte sowie mittelstark für den Kerndurchmesser der Nanosterne. Auch wenn die Polyplex-Größe als einer der kritischen Parameter für die Transfektion angesehen wird,^{86,182} zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation mit der Viabilität oder Transfektionseffizienz.

Die Viabilität dagegen zeigte eine starke negative Korrelation (-0,77) mit dem N/P-Verhältnis und der Menge an zugegebenem Polymer (-0,77). Dies bestätigt die Beobachtung aus früheren Experimenten, dass bei einer Transfektion die N/P-Verhältnisse nicht durch die Zugabe von mehr Polymer angepasst werden sollten, sondern eher indem die Polymerkonzentration auf einem konstanten biokompatiblen Niveau gehalten wird und die Menge an zugegebener DNA angepasst wird (Siehe auch Kapitel 3.2.2).⁸³ Bezogen auf die berechneten Korrelationskoeffizienten (Abbildung 25) wären die Transfektionseffizienzen davon nicht stark betroffen, während die Viabilitäten von diesem Ansatz profitieren sollten. Die Zytotoxizität von PDMAEMA wurde bereits in verschiedenen Zelllinien und mit unterschiedlichen Assays untersucht.^{183,184} Diese Toxizität ist dosisabhängig, auch wenn sich je nach Konzentration die Mechanismen unterscheiden können die zum Zelltod führen.^{151,154} PDMAEMA mit niedrigem Molekulargewicht ist dabei in der Regel weniger toxisch als PDMAEMA mit hohem Molekulargewicht.¹⁸⁵

Sehr starke positive Korrelationen wurden auch zwischen dem zellulären Magnetismus und der zugegebenen Menge an Polymer gefunden (0,83), wohingegen die Korrelation mit der Armdichte (-0,87) und der Nanostern-Masse (-0,88) negativ war. Die Abhängigkeit von der Armdichte wurde bereits in Kapitel 3.2.3.1 diskutiert. Weniger relevant war die Armlänge, auch wenn diese Korrelation ebenfalls negativ (-0,58) war. Die Größe der korrespondierenden Polyplexe zeigte eine positive Korrelation mit der Zahl an magnetischen Zellen. In der Regel führen kleinere Polyplexe zu einem besseren Transfektionsergebnis, insbesondere bei der Magnetofektion.¹⁴² Da es neben der Internalisierung in die Zelle jedoch noch weitere limitierende Schritte gibt, wie beispielsweise das Verlassen der Endosomen oder die Aufnahme der pDNA in den Zellkern,⁸⁵ bedeutet ein höherer Gehalt an Nanopartikeln in der Zelle nicht automatisch eine Zunahme der Transfektionseffizienz. Dies spiegelt sich in der Heterogenität der Daten wider, die keine statistisch signifikante Untersuchung der Korrelation zwischen der Transfektionseffizienz und dem zellulären Magnetismus erlauben.

4. Untersuchung der NP@PDMAEMA-PDEGMA Nanosterne

4.1 Einleitung

Magnetische PDMAEMA-basierte Nanosterne könnten den Startpunkt für die Entwicklung von nicht-viralen, synthetischen Transfektionsagencien mit Potential für medizinische Anwendungen darstellen. Eine Hürde dabei wäre jedoch die Blut-Kompatibilität, die für einfache polykationische Polymere zu gering wäre. Die positiven Ladungen auf der Außenseite der Komplexe führen zu unspezifischen Interaktionen mit Blutbestandteilen wie beispielsweise Proteinen, Erythrozyten, Teilen der extrazellulären Matrix oder Zellen des Immunsystems.^{186,187} Weitere Probleme bei systemischer Applikation stellen beispielsweise die Aufnahme durch Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES), die Filtrierung in den Nieren oder Toxizität dar. Die Anbindung von Plasmaproteinen (auch "Opsonisierung" genannt) stellt dabei den Primärmechanismus für das RES dar, um die zirkulierenden Nanopartikel zu erkennen.¹⁸⁸ Eine Strategie, um diese unspezifischen Interaktionen zu minimieren, stellt die Modifizierung der Oberfläche von kationischen nicht-viralen Vektoren dar, beispielsweise durch die Hinzufügung eines zweiten hydrophilen Polymerblocks wie PEG (Polyethylenglycol), PEO (Polyethylenoxid) oder PDEGMA (Poly(di(ethylenglycol))methylethermethacrylat) dar, um die positiven Ladungen abzuschirmen.¹⁸⁹ PEG stellt hierbei den Goldstandard dar und es konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, dass durch eine solche Modifikation eine verlängerte Zirkulationszeit im Blut bei intravenöser Gabe erreicht werden kann.^{190,191} Allerdings kann PEG auf der Oberfläche die Aufnahme durch die Zellen und die biologische Aktivität vermindern.¹¹ Eine Alternative stellt PDEGMA dar, welches als resistent gegen unspezifische Proteinadsorption gilt.¹⁹²

Um die Blut Kompatibilität der NP@PDMAEMA Nanosterne zu erhöhen, wurde zwei Nanosterne („DB1“ und „DB2“) untersucht, an deren PDMAEMA Arme jeweils noch ein äußerer PDEGMA Block hinzu synthetisiert wurde (Tabelle 5). Es wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass eine solche Modifikation, verglichen mit strukturell ähnlichen unmodifizierten Polymeren zu einer verringerten Zytotoxizität und höheren Transfektionseffizienzen in Anwesenheit von Serum führen kann.^{119,193} Zur besseren Übersicht ist die Tabelle der Nanosterne an dieser Stelle nochmal aufgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Molekulare Charakteristiken der PDMAEMA-PDEGMA Nanosterne

Bezeichnung	Anzahl Arme	Armlänge		Kern Durchmesser (nm)	Grafting density (Ketten/nm ²)	Mn (kg/mol)	PDI
		PDMAEMA block	PDEGMA block				
NS3	20	528	-	15,4	0,024	1660	1,3
NS5	46	1037	-	15,4	0,054	7498	1,6
DB1	91	540	250	28,8	0,035	12000	1,4
DB2	98	1100	4350	28,8	0,038	975000	1,6

Absteigend sortiert nach der Grafting Density. Die beiden PDMAEMA-Nanosterne NS3 und NS5 sind der Vollständigkeit halber mit aufgeführt, da sie in diesem Kapitel ebenfalls untersucht wurden.

PDMAEMA: Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat).

PDEGMA: Poly (di(ethylenglycol)) methylethermethacrylat.

PDI: Polydispersitätsindex (M_w/M_n).

Von den Plasmaproteinen stellt Serumalbumin den größten Anteil mit ungefähr 60% dar.¹⁹⁴ Daher kann mit fötalem Kälberserum (engl. fetal calf serum = FCS) versetztes Kulturmedium dazu verwendet werden, um das in vivo Aggregationsverhalten der Polyplexe beim Kontakt mit Plasmaproteinen nachzubilden. Ein Anteil von 10% FCS im Medium entspricht dabei der physiologischen Konzentration (~ 34 mg/ml).¹⁹⁵

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Größe und Ladung als Funktion des N/P-Verhältnis

Zwei der wichtigsten Parameter für eine Transfektion in vivo stellen Größe und Ladung der Polyplexe dar. Besonders wichtig sind diese beiden Faktoren bei systemischer Applikation, da die Komplexe beim Transport durch die Kapillaren, dem Übertritt aus den Blutgefäßen in das Gewebe und schließlich bei der Internalisierung durch die Zielzellen vielerlei Barrieren überwinden müssen.¹⁹⁶ Negativ geladene Blutbestandteile wie beispielsweise verschiedene makromolekulare Proteine können an kationische Polymere binden und damit große Aggregate bilden, die sowohl den Eintritt in die Zelle als auch die systemische Verteilung beeinträchtigen können.

DB1 stellte die erste Charge der PDEGMA-modifizierten Nanosterne dar und daher wurde zunächst nur eine kleine Menge synthetisiert, die zum Zeitpunkt der Zetasizer Charakterisierung nicht mehr zur Verfügung stand. Analog zu den NP@PDMAEMA

Nanosternen in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 wurden Polyplexe aus DB2 und pEGFP-N1 gemäß dem Transfektionsprotokoll (Kapitel 1.5) gebildet und im Zetasizer die hydrodynamischen Radien per DLS-Messung sowie das Zetapotential bestimmt (Abbildung 26).

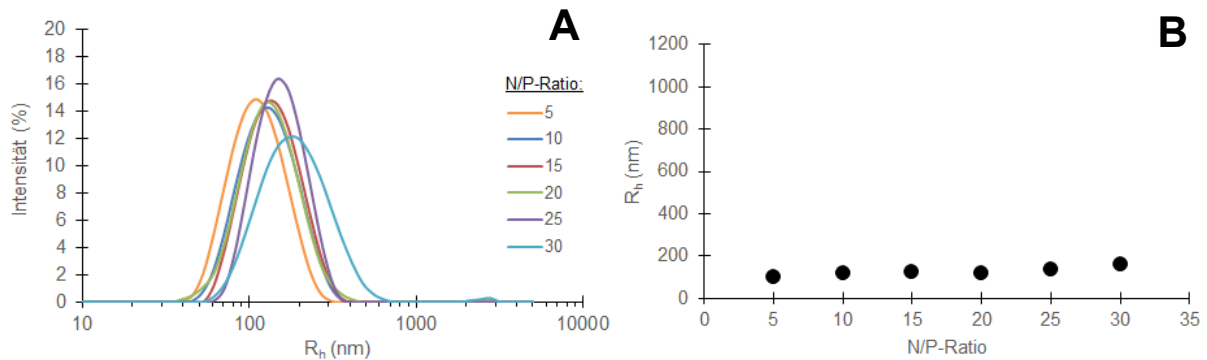


Abbildung 26: Größenmessung mittels DLS von Polyplexen des Nanosterne DB2

Es wurden Polyplexe zwischen DB2 und dem Plasmid pEGFP-N1 unter den Bedingungen des Transfektionsprotokolls bei verschiedenen N/P-Verhältnissen in serumfreiem Kulturmedium (Opti-MEM) gebildet. Die Partikelgrößen wurden im Zetasizer per DLS gemessen. Gezeigt sind die intensitätsgewichteten Verteilungen (A) sowie gemittelten hydrodynamischen Radien in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis (B). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$.

Die Größenmessung zeigte, dass DB2 in der Lage war bei allen untersuchten N/P-Verhältnissen die DNA äußerst effizient im Polyplex zu kondensieren. Die Komplexe waren über einen breiten N/P-Bereich ziemlich konstant in der Größe, es wurden keine Aggregationen beobachtet und die Größenverteilung war monomodal mit einem ausgeprägten Scheitelpunkt (Abbildung 26 A). Die mittleren hydrodynamischen Radien lagen im Bereich 100 – 160 nm (Abbildung 26 B). Dies bestätigt die Beobachtung der vorherigen Messungen der NP@PDMAEMA Nanosterne, dass eine Mindestarmlänge und Grafting Density notwendig ist, um die pDNA effizient zu kondensieren und mit einer vergleichbar kompakten Größe zu bilden. Für eine effiziente Transfektion ist es besonders wichtig, dass Aggregationen vermieden werden und die Polyplexe aufgrund ihrer Größe nicht vom Erreichen des Zielorts ausgeschlossen werden. Die Zetapotentiale waren im bereits ab dem geringsten untersuchten N/P-Verhältnis von 5 stark positiv und über den gesamten gemessenen Bereich hinweg bei ≥ 17 mV (Abbildung 27).

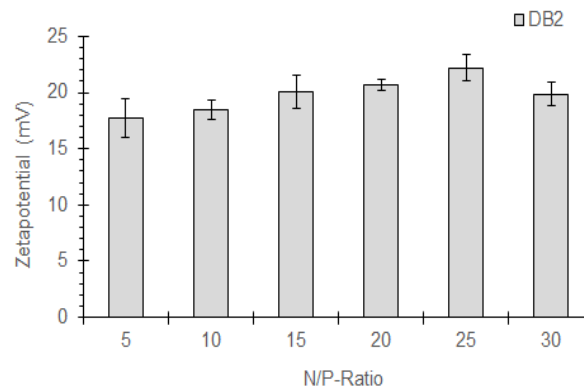


Abbildung 27: Bestimmung des Zetapotentials von DB2 Polyplexen in Abhängigkeit von der N/P-Ratio

Es wurden Polyplexe zwischen dem Nanostern DB2 und dem Plasmid pEGFP-N1 unter den Bedingungen des Standard Transfektionsprotokolls (Kapitel 1.5) bei verschiedenen N/P-Verhältnissen gebildet. Das Zetapotential wurde mittels Zetasizer gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$. Freie Plasmid-DNA (1 μ g/ml) zeigte ein Zetapotential von $-12,2 \pm 1,3$.

Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit PEG-modifizierten PDMAEMA Transfektionsagenzien, die bei Untersuchungen bereits bei einem N/P-Verhältnis von ≥ 2 ein stark positives Zetapotential zeigten.¹⁹⁷ Zu strukturell vergleichbaren PDEGMA-PDMAEMA Polymeren liegen derzeit noch keine Daten zum Zetapotential in der Literatur vor.

4.2.2 Transfektionseffizienz und Magnetismus

4.2.2.1 Korrelation zwischen Magnetismus und Transfektionseffizienz

Um den Einfluss des zusätzlichen PDEGMA-Blocks auf die Transfektion zu untersuchen, wurden analog zu Kapitel 3.2.3.1 Polyplexe aus DB1 oder DB2 mit pEGFP-N1 gebildet und damit CHO-K1 Zellen transfiziert. Nach 26h wurden die Transfektionseffizienzen, Viabilitäten und der Anteil an magnetischen Zellen bestimmt (Abbildung 28). DB1 entsprach in der Armzahl und der Größe des PDMAEMA Blocks dem Nanostern NS4, verfügte jedoch noch pro Arm über einen zusätzlichen PDEGMA Block (250 Einheiten).

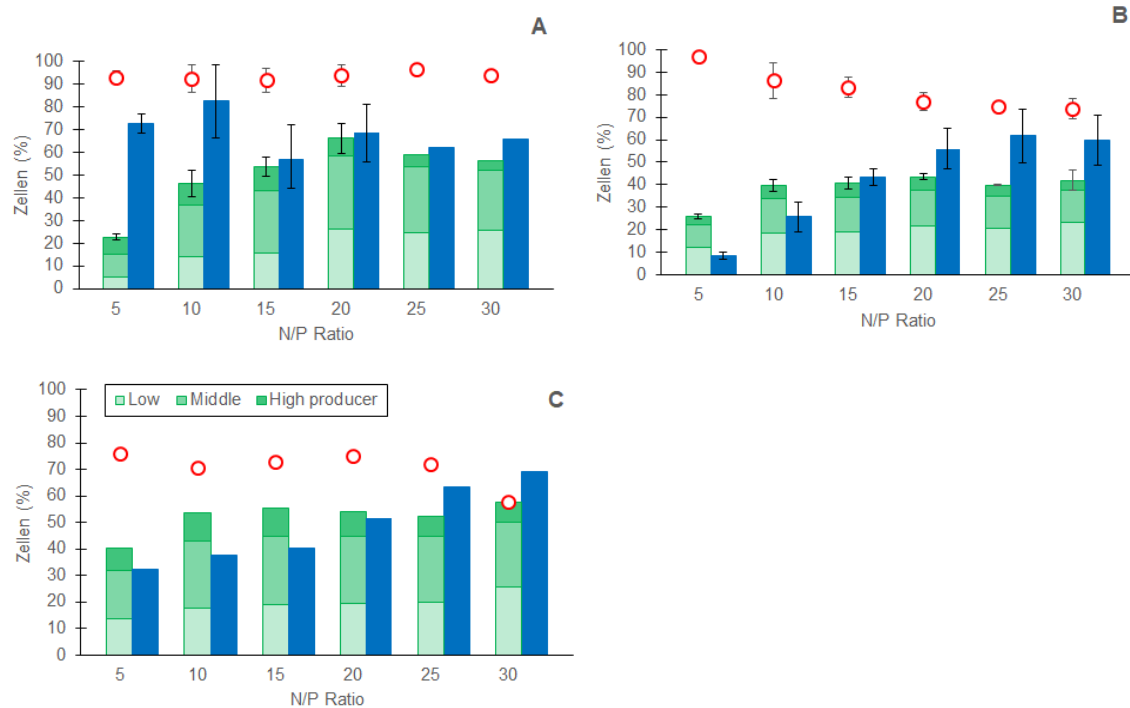


Abbildung 28: Transfektionseffizienzen (■), magnetische Zellfraktionen (■) und Viabilitäten (○)

Es wurden CHO-K1 Zellen mit den PDMAEMA-PDEGMA Nanosternen DB1 (A) und DB2 (B, C) transfiziert, das Medium nach 4h (A, B) ausgetauscht bzw. die Polyplexe über Nacht auf den Zellen gelassen (C) und nach 26 h analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$; $n = 1$ bei DB1 $N/P \geq 25$ (A, B), beziehungsweise entstammen einem Experiment (C).

Der zusätzliche PDEGMA-Block schien die Transfektionseffizienz nicht zu beeinträchtigen, es wurde eine maximale Transfektionseffizienz von 66 ± 7 % erreicht (Abbildung 28 A). Die Zytotoxizität war eher gering, die gemessenen Viabilitäten lagen im gesamten untersuchten N/P-Bereich bei $\geq 90\%$. Beim Magnetismus wurde im Gegensatz zu den NP@PDMAEMA Nanosternen keine statistisch relevante Korrelation mit der N/P-Ratio beobachtet. Der Anteil an magnetischen Zellen war dabei vergleichsweise hoch mit $\sim 60 - 80$ %.

DB2 auf der anderen Seite ähnelte mit der Armzahl und dem PDMAEMA-Anteil am ehesten noch NS5, allerdings war der PDEGMA-Block wesentlich größer mit 4350 Einheiten. Die Transfektionseffizienz war etwas geringer als bei DB1, das Maximum lag bei $\sim 43\%$ EGFP-positiver Zellen (Abbildung 28 B). Auch die Viabilitäten waren deutlich beeinträchtigt, mit Erhöhung des N/P-Verhältnis nahmen diese immer weiter bis auf 74% ab. Wurden die Polyplexe nicht nach 4 h durch Medientausch abgetrennt, sondern über Nacht auf den Zellen gelassen, nahm die Viabilität durchgehend um

weitere ~20% ab (Abbildung 28 C). Allerdings konnte die Transfektionseffizienz dadurch noch etwas gesteigert werden, das Maximum lag bei 57% EGFP-positiver Zellen. Beim Magnetismus wiederum bestätigte sich die vorherige Beobachtung, dass der zelluläre Magnetismus mit der Menge an zugegebenem Polymer korreliert. So steigerte sich der Anteil magnetischer Zellen von 9% bei $N/P = 5$ bis auf 60% bei $N/P = 30$. Wurden die Polyplexe über Nacht auf den Zellen gelassen, so erhöhte sich der Anteil magnetischer Zellen noch geringfügig bis auf maximal 69%, der Unterschied war bei den niedrigeren N/P -Verhältnissen deutlicher als bei den höheren.

Mit einer Molekülmasse (M_n) von 975.000 kg/mol, war der Nanostern DB2 mit Abstand die größte der untersuchten Strukturen. Dennoch waren die Polyplexe, wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt, nicht größer als die Polyplexe, welche mit den kleineren Nanosternen gebildet wurden (Kapitel 2.2.2). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass lediglich die Größe der Polyplexe für die schlechtere Transfektionseffizienz von DB2, verglichen mit NS5/NS6, verantwortlich ist. Mendrek et al. haben gezeigt, dass ein hoher DEGMA Gehalt in der äußeren Hülle von PDMAEMA-basierten Polymeren zu einer höheren Zytotoxizität führt als eine zufällige Verteilung von DMAEMA und DEGMA Einheiten.¹¹⁹ Dies wird bestätigt durch die verbesserte Transfektionseffizienz ($66\% \pm 7\%$; $N/P = 20$) und Biokompatibilität ($94\% \pm 7\%$ Viabilität in CHO-K1 Zellen) des anderen Diblock Nanosterns DB1, welcher zwar über eine ähnliche Armzahl (91) und Grafting Density ($0,035$ Arme/nm²) verfügte, aber über signifikant kürzere PDMAEMA (540 statt 1100) und PDEGMA (250 statt 4350) Blöcke. Die geringere Biokompatibilität von DB2 dürfte daher hauptsächlich in der Größe des PDEGMA Blocks begründet liegen, welche ebenfalls die Transfektionseffizienz beeinträchtigte. Darüber hinaus könnte der nicht-ionische äußere PDEGMA Block die Zellinternalisierung der Polyplexe beeinflussen. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass die Modifikation durch ein hydrophiles Polymer wie DEGMA oder PEG zu einer Veränderung bei der Aufnahme und dem intrazellulären Transport führt.^{198,199}

4.2.2.2 Transfektion in Anwesenheit von Serum

Das Ziel der Modifikation der DMAEMA-Polymerkorona durch das Hinzufügen eines PDEGMA-Polymerblocks war die Erhöhung der Blutkompatibilität der Nanosterne. Ein typisches Indiz für die geringe Blutkompatibilität von polykationischen Transfektionsagenzien stellt der Verlust der Transfektionseffizienz in Anwesenheit von Serum dar. Kationische Polymere können negativ geladene Serumproteine binden und Nanopartikel bilden in serumhaltigem Medium eine Proteinkorona, was die Interaktion mit den Zellen beeinflusst und beispielsweise bei Aggregationsbildung die Aufnahme in die Zelle beeinträchtigt,²⁰⁰ sowie die Transfektionseffizienz sowie Viabilität negativ beeinflussen kann.¹⁴⁶ Die Bildung dieser Proteinkorona wird stark von der Mikroumgebung, wie der Zusammensetzung des Zellkulturmediums, beeinflusst.²⁰¹ Eine weitere Ursache für eine verringerte Transfektionseffizienz in Anwesenheit von Serum kann beispielsweise die Verdrängung der DNA aus dem Komplex durch negativ geladene Serumproteine darstellen.¹⁸⁷

Um die Transfektion in Anwesenheit von Serum zu untersuchen, wurden daher jeweils Polyplexe aus pEGFP-N1 und dem Nanostern mit dem zusätzlichen PDEGMA-Block DB2 nach dem Standard Transfektionsprotokoll (siehe Kapitel 1.5) gebildet. Anschließend wurden die Aliquots des Transfektionsmix zu CHO-K1 Zellen gegeben, die in Opti-MEM Medium ausplattiert waren, welches jeweils 0%, 5% und 10% FCS enthielt. In Abbildung 29 ist das Ergebnis der Transfektion mit DB2 in Anwesenheit von Serum als Funktion des N/P-Verhältnisses aufgeführt.

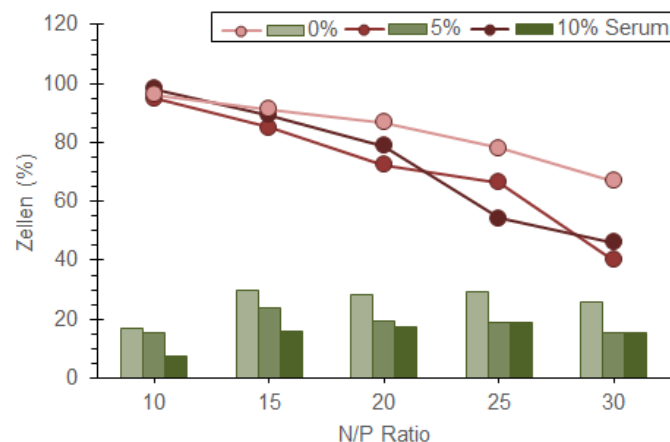


Abbildung 29: Transfektionseffizienz (■) und Viabilität (—●—) von DB2 in der Anwesenheit von fötalem Kälberserum

CHO-K1 Zellen wurden mit DB2 transfiziert, das Serum wurde nach der Polyplex-Bildung zugegeben. Die Daten repräsentieren ein Experiment.

Die Transfektionseffizienzen fielen durchweg in Anwesenheit von Serum ab. Dies wurde für alle untersuchten N/P-Verhältnisse beobachtet. Interessanterweise war für $N/P > 15$ kein Unterschied zwischen den Transfektionseffizienzen in Anwesenheit von 5% und 10% Serum zu beobachten. Allerdings bewirkten erhöhte Konzentrationen von Serum einen negativen Effekt auf die Viabilitäten, insbesondere bei höheren N/P-Ratios. Der Nanostern DB2 zeigte bereits bei serumfreier Transfektion eine erhöhte Zytotoxizität (siehe Abbildung 28). Maiorano et al. (2010) haben gezeigt, dass die Proteinkorona der Nanopartikel zu einer erhöhten Menge an internalisierten Nanopartikeln führen kann, was sich negativ auf die Viabilität auswirkte.²⁰¹ Zusätzlich wäre bei den hohen N/P-Verhältnissen mehr freies Polymer vorhanden, welches als eine der Hauptursachen für die Zytotoxizität von polykationischen Transfektionsagenzien gilt.

Für einen Vergleich mit den Nanosternen ohne zusätzlichen PDEGMA Block wurden unter den gleichen Bedingungen CHO-K1 Zellen jeweils mit den NP@PDMAEMA (NS3, NS5), sowie den NP@PDMAEMA-PDEGMA Nanosternen (DB2) in Anwesenheit von Serum transfiziert. Die N/P-Verhältnisse wurden individuell für jeden Nanostern gewählt, um vergleichbare Transfektionseffizienzen und Viabilitäten sicher zu stellen (Abbildung 30).

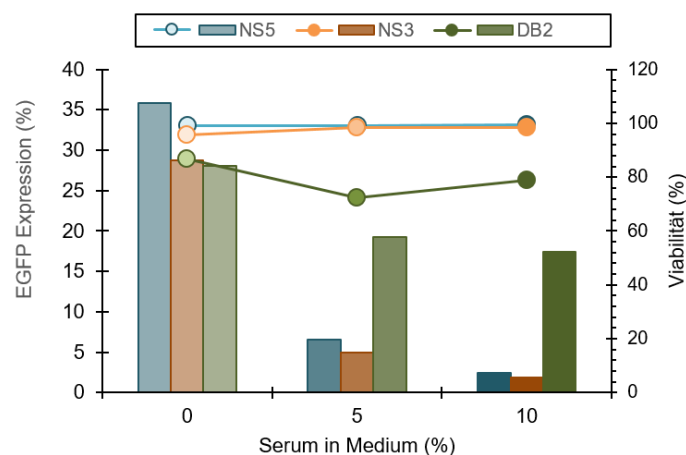


Abbildung 30: Einfluss von Serum auf die Transfektionseffizienzen.

Es wurden CHO-K1 Zellen mit DB2 ($N/P = 20$), NS3 ($N/P = 20$) und NS5 ($N/P = 15$) transfiziert. Der strukturelle Aufbau der Nanosterne: NS3: NP@PDMAEMA₅₂₈)₂₀; NS5: NP@PDMAEMA₁₀₃₇)₄₆; DB2: NP@PDMAEMA_{1100-b-PDEGMA}₄₃₅₀)₉₈. Die Daten repräsentieren ein Experiment.

In allen Fällen wurde ein Abfall der Transfektionseffizienz mit steigender Serumkonzentration beobachtet. Allerdings war dieser Abfall deutlich schwächer ausgeprägt für DB2, als für NS3 und NS5. Als Folge davon zeigte DB2 eine 4fach höhere Transfektionseffizienz als NS3 und NS5 in Anwesenheit von 5% FCS und eine 6fach höhere Transfektionseffizienz in Anwesenheit von 10% FCS. Interessanterweise wurde die Viabilität von NS3 und NS5 kaum beeinträchtigt und lag bei > 95%. Wie schon zuvor (vergleiche Abbildung 29) sank im Falle von DB2 die Viabilität auf bis zu 72% in serumhaltigem Medium herab. Allerdings war die Viabilität auch bei serumfreier Transfektion bereits herabgesetzt (86%). Die erhöhte Zytotoxizität wurde für DB2 bereits bei verschiedenen N/P-Verhältnissen beobachtet (Abbildung 28) und liegt vermutlich in der Größe des PDMAEMA-PDEGMA Blocks begründet, da schon für verschiedene kationische Polymere der Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht und der Zytotoxizität beschrieben wurde. Polymere mit geringem Molekulargewicht sind in der Regel weniger toxisch, dabei allerdings auch meist weniger effizient bei der Transfektion.^{25,26}

5. Lokalisierung der Nanopartikel per Transmissions-elektronenmikroskopie

5.1 Einleitung

Bei einer Transfektion müssen die Polyplexe verschiedene Barrieren überwinden, bis es zu einer erfolgreichen Expression des Transgens führt. Nach der Aufnahme der Komplexe durch die Zelle, werden diese in Endosomen eingeschlossen, aus welchen sie sich befreien müssen, um in das Zytoplasma gelangen. Während die Internalisierung durch Endozytose und die Befreiung aus den Endosomen durch die „proton sponge“ Hypothese erklärt werden können und durch zahlreiche Studien immer besser charakterisiert werden, ist über die darauf folgenden Schritte noch nicht viel bekannt.^{38,85,202} Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht, den Weg der Polyplexe in der Zelle durch Markierung der pDNA oder der Polymere mit Farbstoffen oder Fluoreszenzmarkern nachzuvollziehen.^{49,80,97} Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die dafür notwendigen chemischen Modifikationen die zellinternen

Prozesse nicht beeinflusst werden, beispielsweise durch Adsorption von Proteinen an die Seitengruppen. Darüber hinaus kann es durch Auswaschen oder Dissoziation der Fluoreszenzmarker zu Fehlinterpretationen bei der Analyse der Zellaufnahme oder intrazellulären Verteilung kommen.²⁰³

Die Nanosterne auf der anderen Hand bieten mit ihren Eisenoxid-Kernen gegenüber den gängigen nicht-viralen Transfektionsagenzien den Vorteil, dass sie ohne weitere Modifikationen in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) in der Zelle detektiert werden können. Dafür wird ein Objekt von maximal ~ 100 nm Dicke in ein Vakuum gebracht und einem Strahl von beschleunigten Elektronen ausgesetzt.²⁰⁴ Beim Weg durch die zu untersuchende Probe werden die Elektronen an den Atomkernen gestreut und schließlich auf einem Leuchtschirm detektiert. Die derzeitige Auflösungsgrenze liegt bei 0,045 nm.²⁰⁵ Während biologisches Material in der Regel aus Strukturen mit geringer Elektronendichte besteht und sich ohne zusätzliche Präparierung mit Kontrastmitteln nicht sichtbar von dem Hintergrund abheben würde, sind die elektronendichten Fe₂O₃-Kerne der Nanosterne als dunkle kontrastreiche Strukturen sichtbar. Um einen Einblick in intrazelluläre Verteilung und Lokalisierung der Nanopartikel zu bekommen, wurden daher CHO-K1 Zellen unter Standardbedingungen mit verschiedenen Nanosternen transfiziert. Nach der Ernte der Zellen wurde diese zentrifugiert und die Zellpellets mit Glutaraldehyd chemisch fixiert und vor der Einbettung in Epon-Harz mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat kontrastiert.

Des Weiteren wurde durch eine Analyse der räumlichen Verteilung von Eisen die Nanosterne innerhalb der Zelle lokalisiert. Bei der Elektronenenergieverlust-spektroskopie (EELS) wird eine Probe mit Elektronen bestrahlt, die durch inelastische Elektronenstreuung an den Elektronenhüllen spezifische Energieverluste erleiden und deren Höhe mit einem Spektrometer gemessen wird.²⁰⁶ Diesen Energieverlusten können verschiedene Wirkmechanismen zugrunde liegen. Sie sind unter anderem von den Bindungsverhältnissen im Festkörper und der Zusammensetzung abhängig und erscheinen in einem EELS-Spektrum als Kanten, die für jedes Element spezifisch sind. Durch die Verwendung eines geeigneten Energiefilters können die Elektronen, welche Energieverlust erlitten haben, zur Erstellung der räumlichen Verteilung des zugehörigen Elements ("elemental mapping") in der Probe genutzt werden. Für die Erstellung des Abbilds der räumlichen Verteilung wurde die sogenannte 3-Fenster-

Methode angewendet.^{207,208} Dazu werden mindestens drei Aufnahmen bei drei verschiedenen Energien verwendet. Eine Aufnahme erfolgt knapp hinter der Energieverlustkante und ist spezifisch für das Element, welches abgebildet werden soll. Die anderen beiden Aufnahmen liegen außerhalb der Energieverlustkante und gehören zu den Ausläufern einer benachbarten Kante. Dieser Energieverlust gehört jedoch nicht zum gesuchten Element und wird daher als Hintergrundrauschen bezeichnet und herausgerechnet. Auf diese Weise verbleiben für das Elemental Mapping lediglich die Elektronen der gesuchten Energieverlustkante. Da hochdichte Eisenansammlungen natürlicherweise nicht in CHO-Zellen vorkommen, können die γ - Fe_2O_3 -Nanopartikel mit dieser Methode vom Rest der Zelle unterschieden werden.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Dokumentation der Nanosterne via Cryo-TEM

Vor der intrazellulären Lokalisierung der Nanopartikel wurden zunächst Cryo-TEM Aufnahmen der Nanosterne NS5 und NS6 angefertigt. Bei dieser Methode werden die wässrigen Proben auf ein sogenanntes grid aufgebracht und bei unterhalb von -135°C schockgefroren. Das Wasser bildet an diesem Punkt keine Eiskristalle und bleibt im amorphen Zustand durchsichtig, was eine nahezu Artefakt freie Darstellung von bis zu 170 kD kleinen Strukturen ermöglicht.^{209,210} Da direkt die wässrigen Polymerlösungen verwendet werden können, ist dabei keine aufwendige Präparierung wie bei der Fixierung und Kontrastierung von biologischem Material notwendig.

Die Cryo-TEM Aufnahmen zeigten typische sphärische kontrastreiche Partikel und entsprechen den TEM Aufnahmen von anderen SPIONs mit vergleichbarer Struktur (Abbildung 31).^{157,211} An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass mit dieser Methode nur der elektronendichte Fe_2O_3 -Kern der Nanosterne und nicht die Polymer Korona sichtbar wird. Dabei wurden keine größeren Nanostern-Aggregationen gefunden. Um den Durchmesser der Eisenoxid-Kerne zu bestimmen, wurden per ImageJ²¹² aus den Aufnahmen binäre Bilddateien erstellt und über die Kreisfläche der Durchmesser berechnet. Die auf diese Weise berechneten mittleren Durchmesser betrugen $8,02 \pm 0,89$ nm für NS5 und $8,17 \pm 0,46$ für NS6.

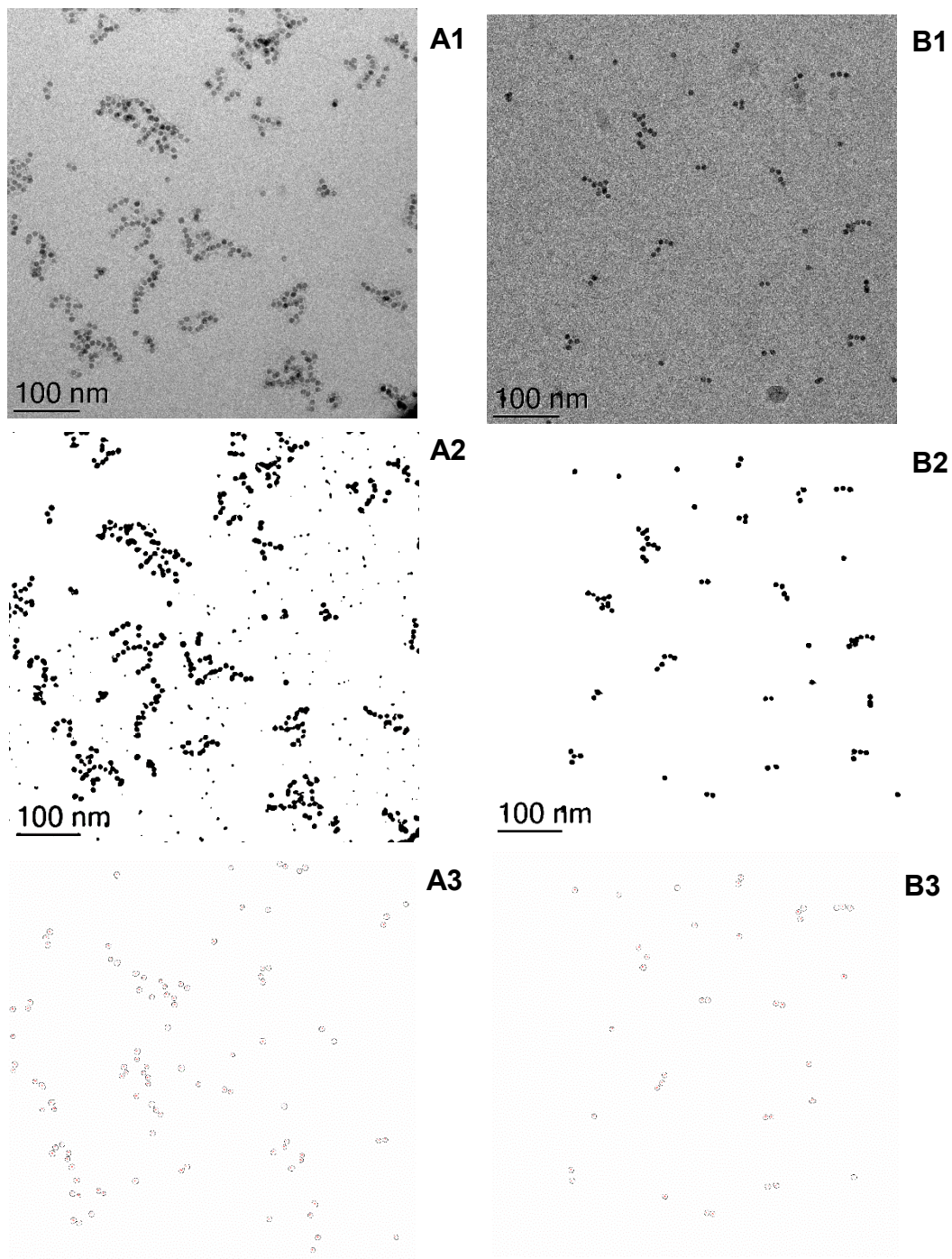


Abbildung 31: Cryo-TEM Aufnahmen der Nanosterne NS4 und NS5

Von wässrigen Polymerlösungen wurden Aufnahmen von NS4 (A) und NS5 (B) angefertigt. Um den Durchmesser der Partikel zu bestimmen, wurden zunächst die Aufnahmen mit ImageJ aufbereitet per FFT-Bandpass Filter und der adjust threshold Funktion (A2, B2). Die Partikel wurden anschließend über die Analyze Particles Funktion identifiziert und analysiert (A3, B3).

5.2.2 Etablierung des Präparationsprotokolls

Zum Zwecke der Präparierung der CHO-K1 Zellen für die Elektronenmikroskopie musste zunächst ein Protokoll etabliert werden. Im Rahmen der Masterarbeit wurde bereits eine Flacheinbettung von transfizierten CHO-K1 Zellen durchgeführt, allerdings konnten auf den dabei entstandenen Bildern keine Nanopartikel lokalisiert werden. Ein weiteres Problem der Flacheinbettungen bestand in der geringen Zelldichte der Präparate. Für die folgenden TEM-Studien wurden daher Zellpellets statt Flacheinbettungen für die Präparierung gewählt. Das Vorgehen der Präparierung der CHO-K1 Zellen wurde dabei von dem Protokoll von Rogowski et al.²¹³ adaptiert, welches eigentlich für die Präparierung von *Chlamydomonas* Zellen entwickelt wurde. Da Säugerzellen wie CHOs sich gegenüber Grünalgenzellen in ihrer Morphologie teils erheblich unterscheiden, war eine schonendere Präparation notwendig. Beispielsweise verfügen CHO-Zellen nicht über eine Zellwand und sind daher wesentlich empfindlicher gegenüber Störungseinflüssen wie beispielsweise Scherkräften. Da das Ziel der Präparierung eine Fixierung der Zellen möglichst in ihrem nativen Zustand darstellte, war es insbesondere bis zum ersten Fixierungsschritt der Glutaraldehyd Zugabe notwendig, die Zellen weitestgehend zu schonen. Ein kritischer Punkt für alle nachfolgenden Schritte stellte die Pelettierung der Zellen dar. Während eine zu starke Zentrifugation zur Deformierung bis teilweise Zerstörung der Zellen führen könnte, würde eine zu schwache Zentrifugation zu einem losen Zellpelett führen, welches unter Umständen bei den weiteren Präparierungsschritten durch mechanische Einwirkung zerfällt. Um die Unversehrtheit der CHO Zellen sicher zu stellen, wurde daher eine Test-Zentrifugation mit unbehandelten CHO-Kontrollzellen durchgeführt und diese anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Würde sich etwas an der Form der Zellen ändern, so wäre dies an der Abweichung im Histogramm des Vorwärtsstreulichts (FS = Forward Scatter) oder des Seitwärtsstreulichts (SS = Side Scatter) erkennbar. Dabei gibt FS die Zellgröße und SS die Zelldichte wieder. Würden die Zellen beispielsweise apoptisch werden oder durch die erhöhten Zentrifugationskräfte mechanisch zerstört werden, würde dies an den beiden Parametern sichtbar werden.^{127,214} Darüber hinaus wurde durch Propidiumiodid Zugabe die Viabilität bestimmt.

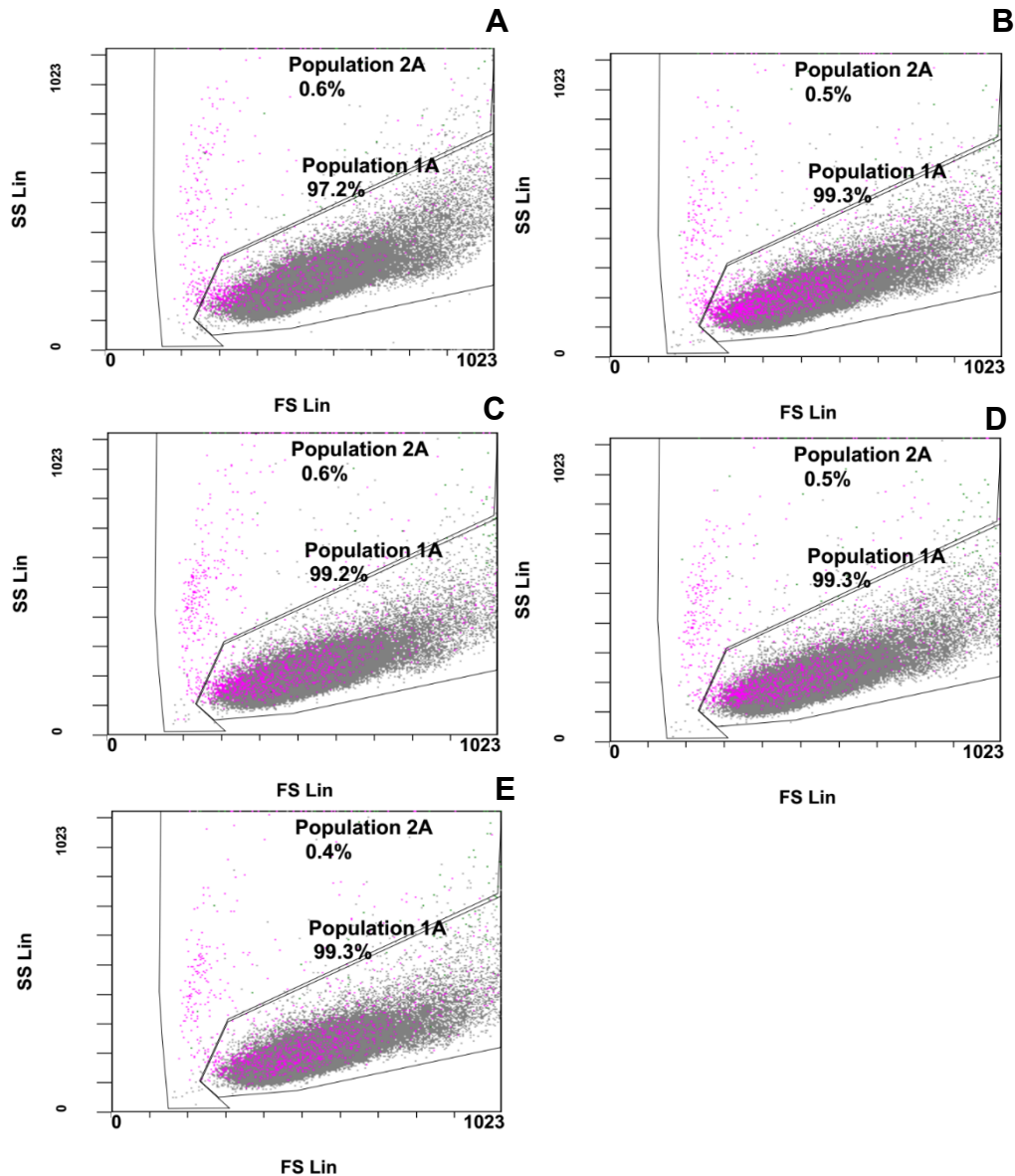


Abbildung 32: Analyse von zentrifugierten CHO-K1 Zellen im Durchflusszytometer

Adhärenzte CHO-K1 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert, durch Trypsin-Zugabe geerntet, in 5 verschiedene Aliquots zu je 3×10^6 Zellen aufgeteilt und für 5 min verschieden starken Zentrifugalkräften ausgesetzt: 400 g (A), 600 g (B), 800 g (C), 1025 g (D), 1050 g (E). Jeder Punkt des Dot-Plots bedeutet 1 Messsignal (in der Regel = eine Zelle), dargestellt ist die logarithmische Auftragung nach dem Vorwärtstreulicht (FS = Forward Scatter) und des Seitwärtstreulichts (SS = Side Scatter). Es wurden 2 Gates festgelegt: In Region 1A befinden sich die Zellen in ihrem nativen Zustand, davon abweichende Zellen sind in 2A zu finden. Violett eingefärbt sind Propidiumiodid-positive Zellen (= tote Zellen). Die Viabilität war bei allen Proben > 97%.

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass selbst die höchste angelegte Zentrifugationsstufe mit 1050 g nicht zu Veränderungen in der Verteilung der Zellpopulation im SS-/FS-Histogramm führte. Die Viabilität lag dabei durchweg bei > 97%. Für die nachfolgende Präparation der Zellen wurden diese daher bei 1050 g für 5 min zentrifugiert.

Pro Ansatz werden $3 - 5 \cdot 10^6$ Zellen benötigt, damit das Pellet groß genug für die Handhabung während der Präparation ist. Das Präparationsprotokoll wurde auf diese Zellzahl hin optimiert. Die benötigte Zellzahl richtet sich dabei nach dem Zelltyp und der Zellgröße. Ist das Pellet zu groß, kann das zum Misslingen der Präparation führen, insbesondere beim Schritt der Entwässerung und des Durchdringens mit Epon, da diese Prozesse einfacher Diffusion unterliegen und bei einem dickeren Pellet unter Umständen die Inkubationszeiten verlängert werden oder die Lösungen häufiger getauscht werden müssen.

5.2.3 Lokalisierung der Nanosterne in transfizierten Zellen mittels TEM

In Kapitel 3.2.3 wurden verschiedene adhärente Zelllinien von Säugerzellen mit den Nanosternen transfiziert und anschließend auf ihre EGFP-Expression und den zellulären Magnetismus hin untersucht. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte bei den meisten Experimenten nach 26 - 30 h. Um die intrazelluläre Verteilung der Nanosterne zu diesem Zeitpunkt zu untersuchen, wurden CHO-K1 Zellen jeweils mit den Nanosternen NS1, NS2, NS5 und NS6 transfiziert und nach 26h mit der Fixierung der Zellen gestartet. Die Nanosterne und N/P-Verhältnisse wurden entsprechend aus den Erkenntnissen der vorherigen Experimente (siehe Kapitel 3.2.3.1) so gewählt, dass entweder möglichst viele Zellen magnetisch (NS1, NS2) oder EGFP-positiv sind (NS5, NS6). Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die Zellen auch tatsächlich genug Nanosterne aufgenommen oder zumindest gebunden haben. Es zeigte sich, dass von allen Nanosternen Ansammlungen in den präparierten CHO Zellen gefunden wurden und diese ausreichend Kontrast besaßen um sich vom Hintergrund des Zellinneren abzuheben (Abbildung 33 - Abbildung 37). Dabei gelang es hochaufgelöste Aufnahmen von einzelnen Nanopartikeln anzufertigen (Abbildung 34).

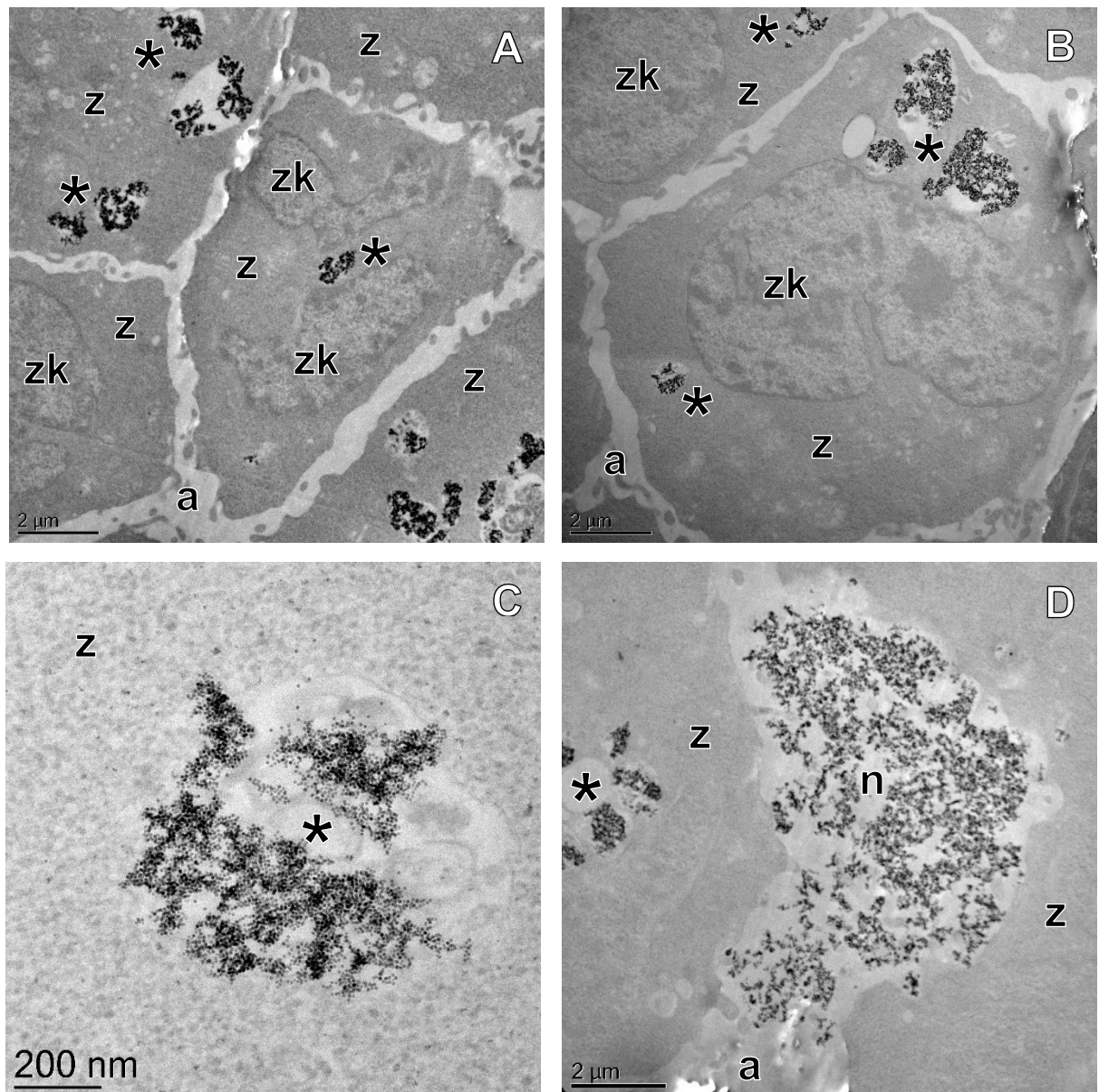


Abbildung 33: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS2 Nanosternen

CHO-K1 Zellen wurden mit Polyplexen aus pEGFP-N1 und NS2 (N/P = 10) transfiziert und nach 26h Inkubationszeit gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert. Gezeigt sind eine ganze Zelle zur Übersicht (A, B), MVB-artige Strukturen mit assoziierten Nanopartikeln (C) sowie extrazelluläre Nanopartikel Ansammlungen (D). Markierte Strukturen: Zytoplasma (z), MVB-Strukturen mit Nanopartikeln (*). Bereich außerhalb der Zelle (a), Zellkern (zk), extrazelluläre Nanopartikel Aggregationen (n), Zytoplasma (z).

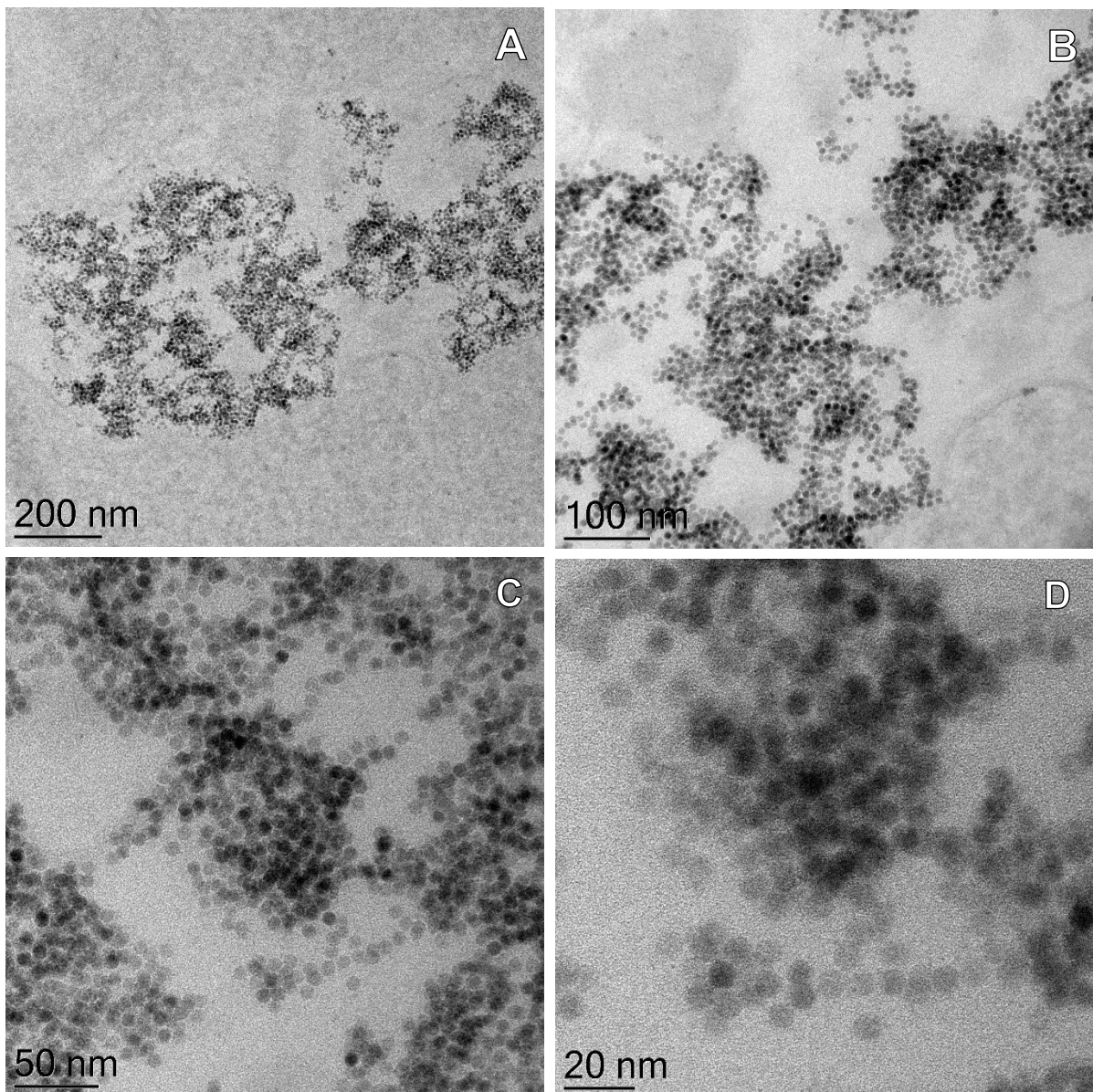


Abbildung 34: TEM Aufnahmen von NS2 Nanopartikel-Clustern in CHO Zellen

CHO-K1 Zellen wurden mit Polyplexen aus pEGFP-N1 und NS2 (N/P = 10) transfiziert und nach 26h Inkubationszeit gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert.

Gezeigt ist eine intrazelluläre Ansammlung von NS2 Nanopartikeln in aufsteigender Vergrößerung.

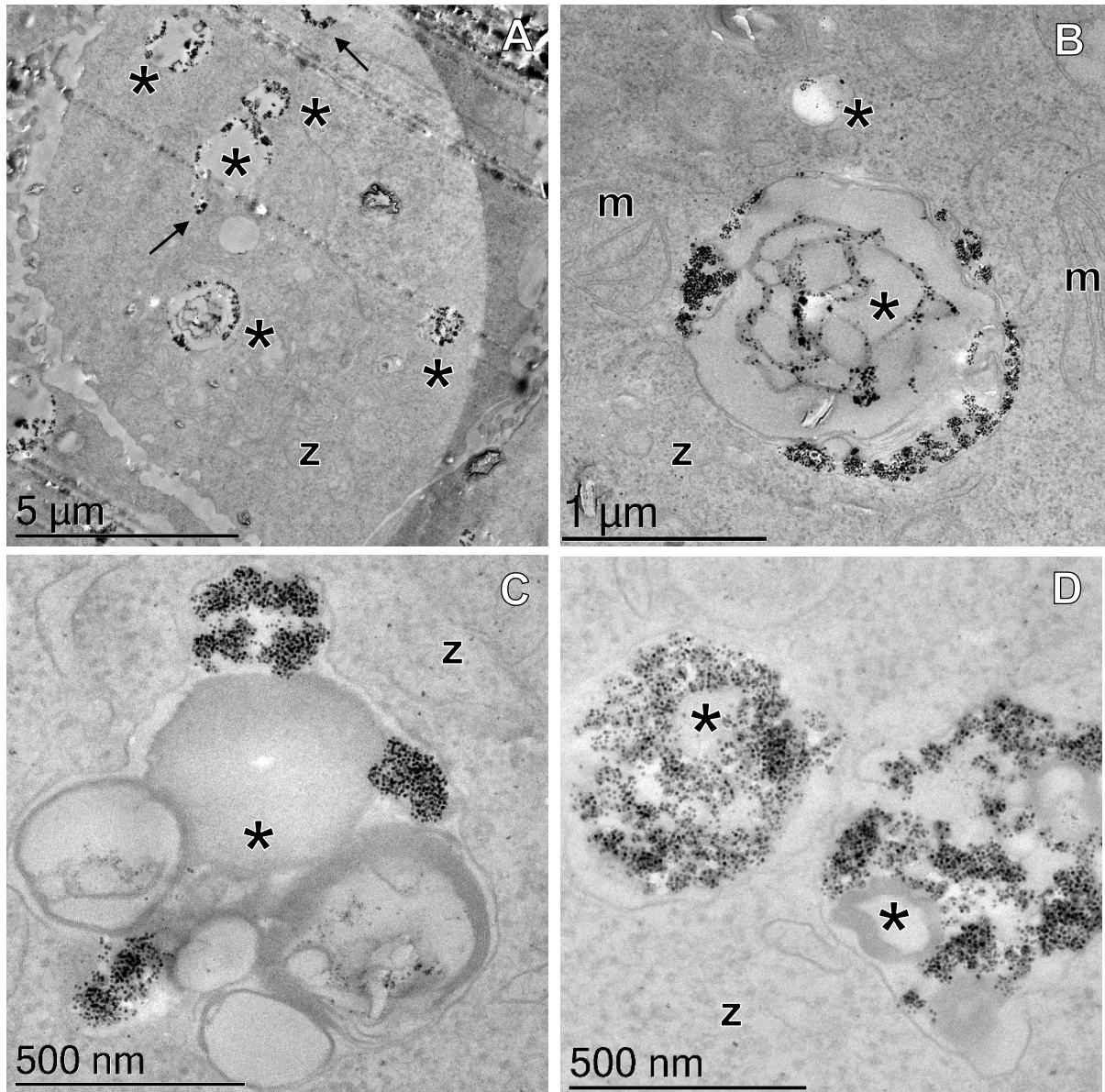


Abbildung 35: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS1 Nanosternen

CHO-K1 Zellen wurden mit Polyplexen aus pEGFP-N1 und NS1 (N/P = 20) transfiziert und nach 26h Inkubationszeit gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert.

Gezeigt sind eine ganze Zelle zur Übersicht (A) und MVB-artige Strukturen mit assoziierten Nanopartikeln (B, C, D). Markierte Strukturen: Nanopartikel (schlanker Pfeil), Zytoplasma (z), MVB-Strukturen mit Nanopartikeln (*), Mitochondrium (m).

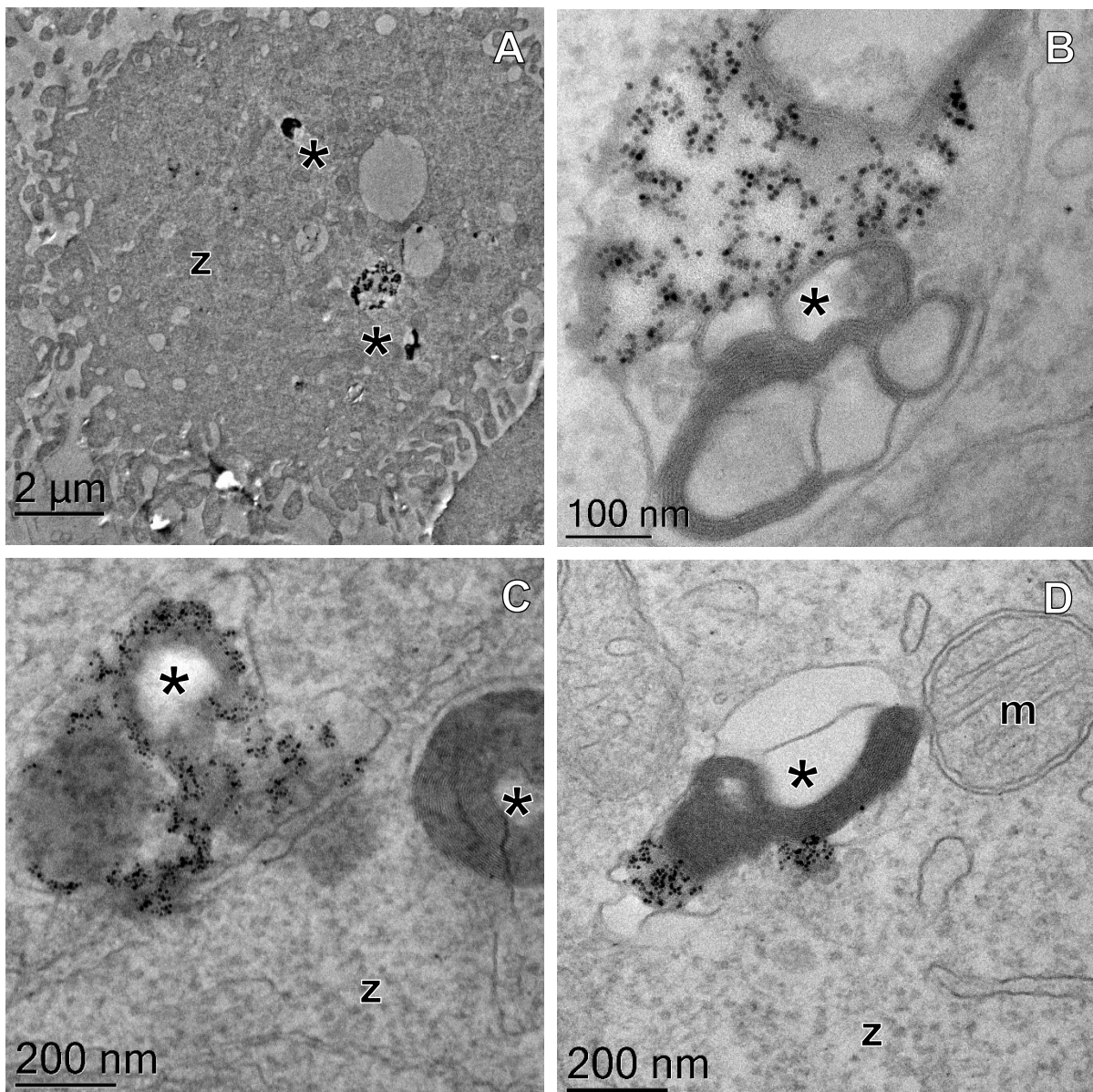


Abbildung 36: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS5 Nanosternen

CHO-K1 Zellen wurden mit Polyplexen aus pEGFP-N1 und NS5 (N/P = 30) transfiziert und nach 26h Inkubationszeit gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert.

Gezeigt sind eine ganze Zelle zur Übersicht (A) und MVB-artige Strukturen mit assoziierten Nanopartikeln (B, C, D). Markierte Strukturen: Nanopartikel (schlanker Pfeil), Zytoplasma (z), MVB-Strukturen mit Nanopartikeln (*), Mitochondrium (m).

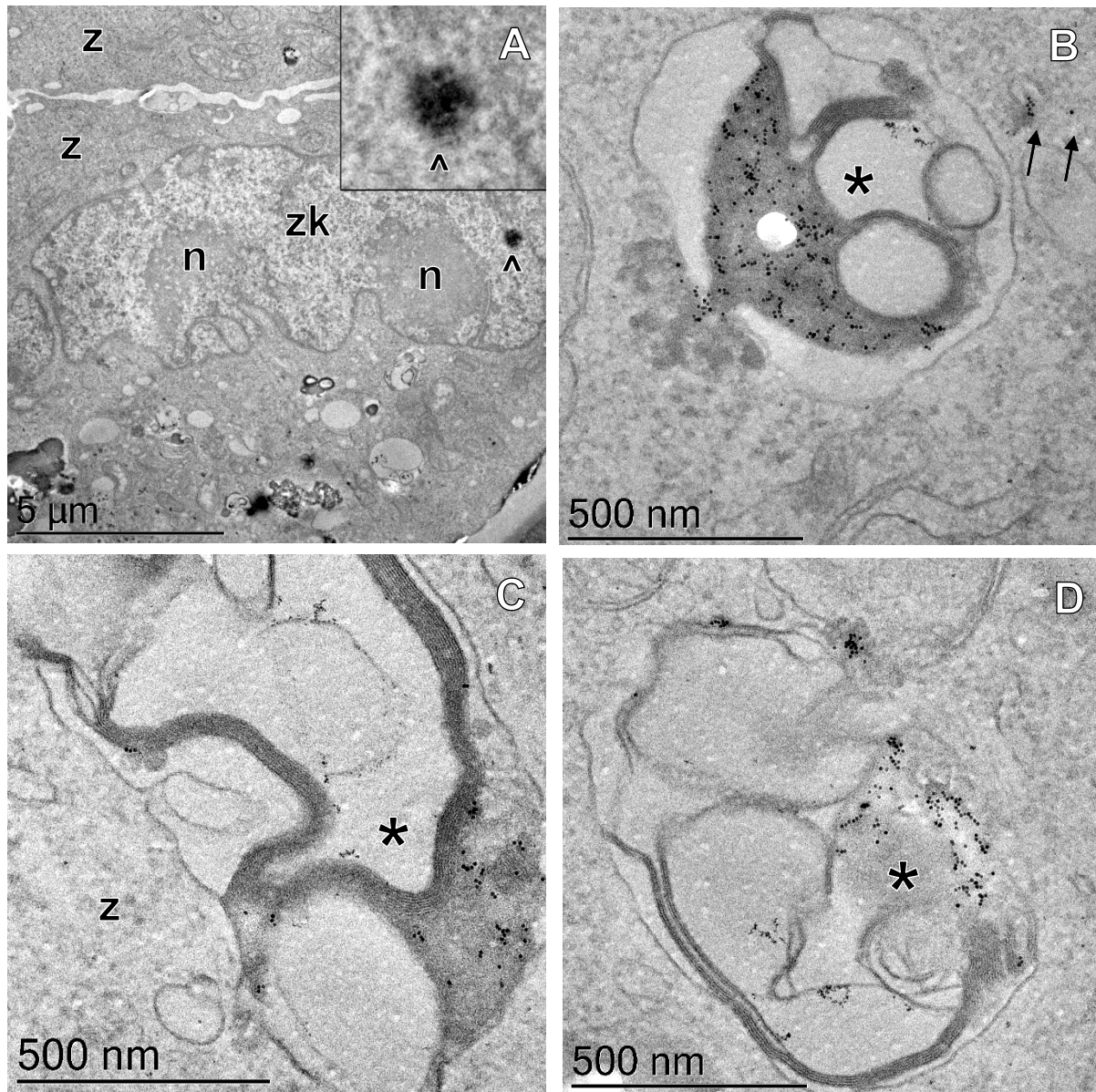


Abbildung 37: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS6 Nanosternen

CHO-K1 Zellen wurden mit Polyplexen aus pEGFP-N1 und NS6 (N/P = 25) transfiziert und nach 26h Inkubationszeit gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert.

Gezeigt sind eine ganze Zelle zur Übersicht (A) und MVB-artige Strukturen mit assoziierten Nanopartikeln (B – D). Markierte Strukturen: Nanopartikel (schlanker Pfeil), Zellkern (zk), Nucleolus (n), Zytoplasma (z), MVB-Strukturen mit Nanopartikeln (*), potentielle Polyplex-Struktur (^).

Sofern die Endosomen nicht vorher aufgelöst werden, werden die Nanopartikel in Vesikel eingeschlossen.^{169,215} Diese vesikulären Nanopartikel Aggregationen sind beispielsweise in Abbildung 33 A & B gut zu erkennen. Die Ursache für intrazelluläre Aggregationen von SPIONs können beispielsweise chemische Destabilisierung oder Adsorption von Biomakromolekülen darstellen.^{113,114} Des Weiteren ist bekannt, dass das saure Milieu der Lysosomen die Aggregation von Nanopartikeln fördert, was die Biodegradation durch die Zelle erschwert.¹⁷⁸

Wesentlich häufiger wurden die Nanopartikel zusammen mit multivesikulären Strukturen gefunden, welche auch als MVBs („multivesicular bodies“, in den Abbildungen mit * markiert) bezeichnet werden.²¹⁶ Dabei handelt es sich um eine Untergruppe von Endosomen, die membrangebundene intraluminale Vesikel enthalten, welche sich durch Einknospung in das Lumen des MVB bilden. Der Inhalt von MVBs kann entweder durch die Fusion mit einem Lysosom degradiert werden oder durch Fusion mit der Plasmamembran in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Es wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet, dass internalisierte Nanopartikel in späten Endosomen / multivesikulären späten Endosomen eingeschlossen bleiben und schließlich über verschiedene Wege der Zelle recycelt werden.²¹⁷

Unterschiedlich stark ausgeprägt sind dabei die Regionen mit diffusem elektronendichtem Material, bei dem es sich vermutlich hochdichte Proteinansammlungen handelt.¹⁷⁸ Dies traf für alle vier Nanosterne zu. Bei diesen Strukturen handelt es sich wahrscheinlich um späte Endosomen oder, besonders im Falle der elektronendichteren Strukturen, um Heterolysosomen.^{178,218} Nanostern-Aggregationen oder freie Nanosterne im Zytoplasma wurden nicht gefunden.

Vergleicht man die intrazellulären Aggregationen der verschiedenen Nanosterne untereinander, dann fällt auf, dass NS1 und NS2 wesentlich größere Cluster zu bilden scheinen als die Nanosterne NS5 und NS6. Ein Grund hierfür könnte sein, dass NS1 und NS2 weniger und kürzere PDAMEMA-Arme besitzen, was eine Verringerung der Ladungsdichte bedeutet wodurch sich die Nanosterne weniger stark gegenseitig abstoßen. Diese Aggregationseffekte der mit NS1 und NS2 gebildeten Polyplexe wurden auch schon bei den DLS-Messungen beobachtet (Kapitel 2.2.2). Dies könnte auch den auffällig hohen Anteil an magnetischen Zellen bei einer Transfektion mit diesen beiden Nanosternen erklären (Kapitel 3.2.3.1). Darüber hinaus wurden auch

extrazelluläre Nanostern Aggregationen gefunden (Abbildung 33 D). Das Vorhandensein von extrazellulären Nanostern Aggregationen trotz mehrfachem Medienwechsel im Rahmen des Transfektionsprotokolls (Kapitel 1.5) und den Waschschritten bei der Präparation der Zellen für die Elektronenmikroskopie (Kapitel 5.2.2) könnte einen Hinweis auf persistente Bindung der Nanosterne an die Zelloberfläche darstellen. Eine irreversible Aggregation von Nanosternen auf der Außenseite der Zelle könnte erklären, warum bei manchen Nanosternen wie beispielsweise NS2 eine hohe Zahl von magnetischen Zellen bei gleichzeitig verhältnismäßig geringer Transfektionseffizienz gemessen wurde (Abbildung 17). Die unspezifische Anlagerung von Nanopartikeln an der Membranaußenseite führt nicht zwangsweise zu einer effektiven Internalisierung in die Zelle.^{169,219}

Ob Polyplexe in den Zellkern gelangen oder ob eine Dissoziation der pDNA-Polymer-Komplexe im Zytosol stattfinden muss, wird kontrovers diskutiert. Beispielsweise wurde gezeigt, dass durch die Membran-disruptiven Eigenschaften von verschiedenen Polymeren die Internalisierung in den Zellkern gefördert wird.¹⁵² Direkte Mikroinjektion von Polyplexen aus PEI und pDNA führte zu einer vergleichsweise hohen Transgen-Expression, was eine Dissoziation der Polyplexe im Zellkern andeutet und die Bedeutung der Kernhülle als Barriere während einer Transfektion unterstreicht.²²⁰

Im Falle der Nanosterne konnten keine Nanopartikel im Zellkern zweifelsfrei identifiziert werden. Auf einer Aufnahme ist eine auffällig kontrastreiche Stelle im Zellkern zu finden, bei der es sich nicht um den Nukleolus oder andere kontrastreiche Strukturen biologischen Ursprungs handeln kann, die sich im Zellkern befinden (Abbildung 37 A). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei auch um Artefakte, beispielsweise der Nachkontrastierung mit Uranylacetat handelt, da auch in Vergrößerung keine sphärisch geformten Nanopartikel zweifelsfrei identifizierbar sind.

5.2.4 TEM-Aufnahmen transfizierter CHO Zellen in Abhängigkeit von der Interaktionszeit

Im vorherigen Kapitel wurden die Nanosterne in transfizierten CHO-Zellen per Transmissionselektronenmikroskopie lokalisiert. Allerdings wurden diese Zellen erst 26h nach Polyplex Zugabe fixiert. Im Folgenden soll daher nun das Anfangsstadium der Transfektion und damit die Aufnahme der Polyplexe durch die Zelle dokumentiert werden. In Kapitel 3.2.3.2 wurde gezeigt, dass die Aufnahme relativ rasch erfolgt und bereits 15 min Interaktionszeit zwischen den Polyplexen und den CHO Zellen ausreicht, um einen Tag später transfizierte und magnetische Zellen nachweisen zu können. Um das Zeitfenster näher zu untersuchen, wurden Polyplexe aus jeweils pEGFP-N1 und den Nanosternen NS6 und NS12 gebildet, in getrennten Ansätzen zu CHO-K1 Zellen gegeben und das Transfektionsmedium zu unterschiedlichen Zeiten ausgetauscht: Nach 5 min, 15 min, 30 min, 1h und 4h. Der Nanostern NS6 wurde ausgewählt, da mit diesem bei den Transfektionsexperimenten die höchste Transfektionseffizienz erreicht wurde (siehe Kapitel 3.2.3.1). Als weiterer Nanostern wurde mit NS12 der größte Vertreter der NP@PDMAEMA Nanosterne ausgewählt. Anschließend wurden die Zellen direkt durch Zugabe von Glutaraldehyd fixiert und präpariert. Von den Zellen mit einer Interaktionszeit von 4h wurde ein Aliquot genommen und für weitere 26 h in Kultur gehalten bevor die Zellen fixiert wurden. Dies entspricht somit der Präparierung der Zellen aus Kapitel 5.2.3.

In den Zellen, die mit NS6 transfiziert wurden, konnten bereits nach 15 min Interaktionszeit intrazelluläre Nanosterne per TEM identifiziert werden (Abbildung 38 B). Die Aufnahme zeigt den Einschluss in eine vesikuläre Struktur, bei der es sich wahrscheinlich um ein frühes Endosom handelt, da nur die Membran und die davon eingeschlossene Polyplex-Struktur zu sehen sind. Wurden die Zellen nach Austausch des Transfektionsmediums für weitere 22 h inkubiert, so zeigte sich wieder die charakteristische Aggregation der Nanosterne mit diffusem elektronendichtem Material und den multilamellaren Strukturen, die auch schon in Kapitel 5.2.3 beschrieben wurden.

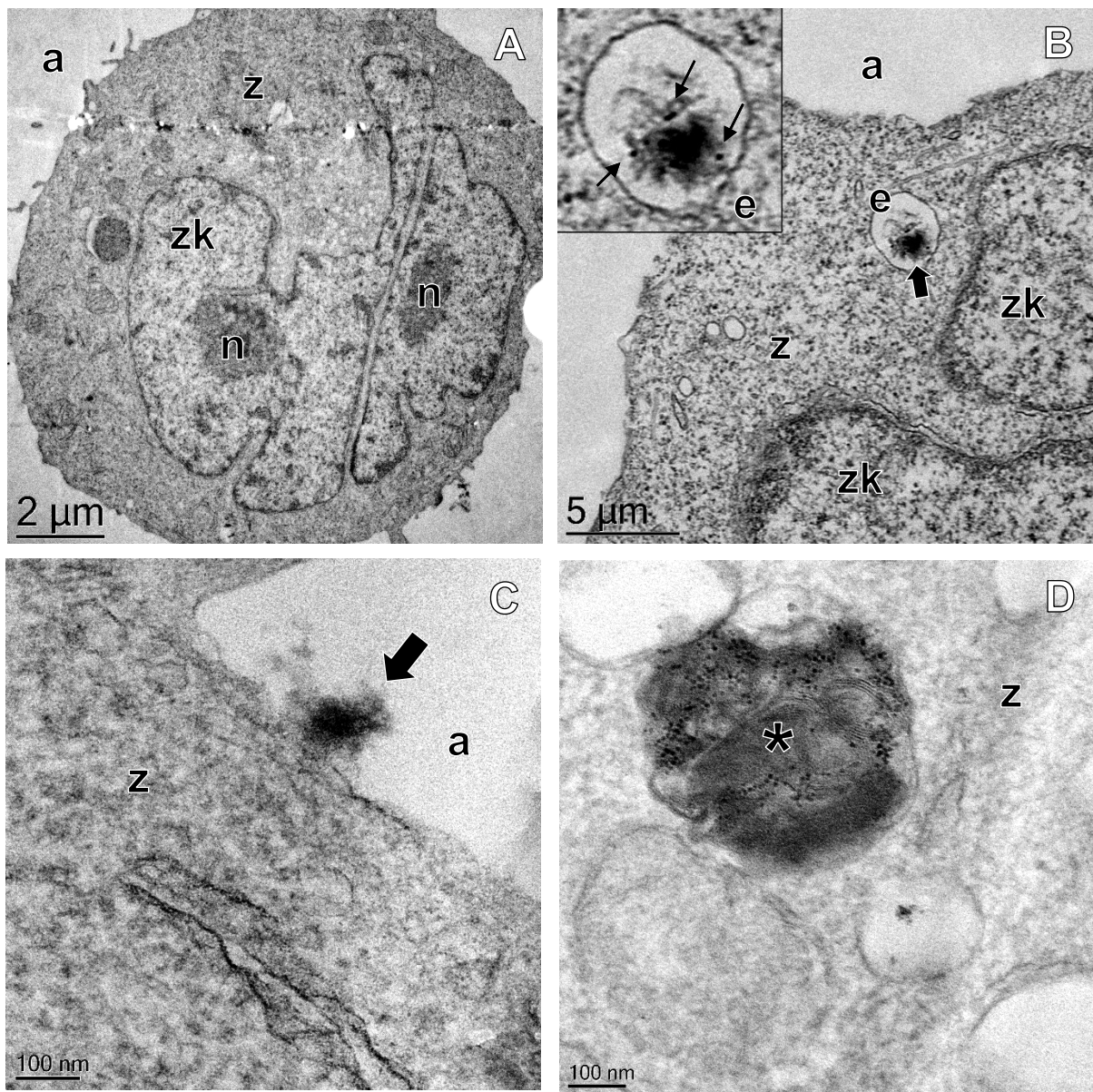


Abbildung 38: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS6 Nanosternen

Es wurden Polyplexe aus pEGFP-N1 und NS6 (N/P = 25) gebildet, in getrennten Ansätzen zu CHO-K1 Zellen gegeben und das Transfektionsmedium zu unterschiedlichen Zeiten ausgetauscht: Nach 15 min (A, B), nach 1 h (C) oder nach 4 h (D). Anschließend wurden die Zellen entweder direkt gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert (A – C) oder zunächst für weitere 26h inkubiert und anschließend fixiert (D). Gezeigt sind eine ganze Zelle zur Übersicht (A), ein Endosom mit eingeschlossener Polyplex Struktur (B), eine Polyplex-Struktur an der Zellaußenseite (C) und MVB-artige Strukturen mit assoziierten Nanopartikeln (D). Markierte Strukturen: Nanopartikel (schlanker Pfeil), Polyplexe (dicker Pfeil), Zellkern (zk), Nucleolus (n), Zytoplasma (z), MVB-Strukturen mit Nanopartikeln (*), Endosom mit Polyplex (e), Bereich außerhalb der Zelle (a). Berechneter Durchmesser der Polyplexe: B: 2430 nm, C: 152 nm.

Bei den Transfektionsexperimenten zeigte NS12 nur eine geringe Transfektionseffizienz und kaum zellulären Magnetismus (Vergleiche Abbildung 17). Konsequenterweise konnten nur wenig Nanosterne auf den TEM Aufnahmen lokalisiert werden. Die ersten inkorporierten Nanosterne wurden nach einer Interaktionszeit von 30 min und 1h lokalisiert (Abbildung 39). Dabei handelte es sich wiederum um Polyplexe in frühen Endosomen. Interessanterweise konnten in den Zellen, die nach 4 h Interaktionsdauer fixiert wurden, bereits die Colokalisierung der Nanosterne mit multilamellaren Strukturen identifiziert werden (Abbildung 39 C, D). Vergleicht man diese mit den Aufnahmen der Zellen, die erst nach 26 h fixiert wurden, so scheint die Zahl an aggregierten Nanopartikeln geringer zu sein und die Bildung der membranösen Strukturen ist weniger weit fortgeschritten. Für beide Nanosterne war die typische Entwicklung der Morphologie der Endosomen von durchscheinenden zu wesentlich dichteren, multivesikulären Vesikeln zu sehen.²²¹

Darüber hinaus konnten Polyplexe sowohl von NS6 als auch von NS12 an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert werden (Abbildung 38 C, Abbildung 40), interessanterweise ausschließlich bei den Zellen, die 1h lang mit den Polyplexen behandelt wurden. Der Prozess der Endozytose, das heißt das Einstülpfen der Biomembran, ist dabei allerdings nicht zu sehen. Die Durchmesser der Polyplexe wurden unter der Annahme einer kreisförmigen Fläche bestimmt und lagen für NS12 im Bereich ~150 – 275 nm. Die extrazellulären Polyplexe von NS6 waren bedeutend kleiner (152 nm) als die intrazellulären Polyplexe, die bereits in Vesikel eingeschlossen waren (2430 nm). Vermutlich haben letztere bereits mit Material der Zelle aggregiert.¹¹⁴ Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Polyplexe gemeinsam von der Zelle aufgenommen und eingeschlossen werden.

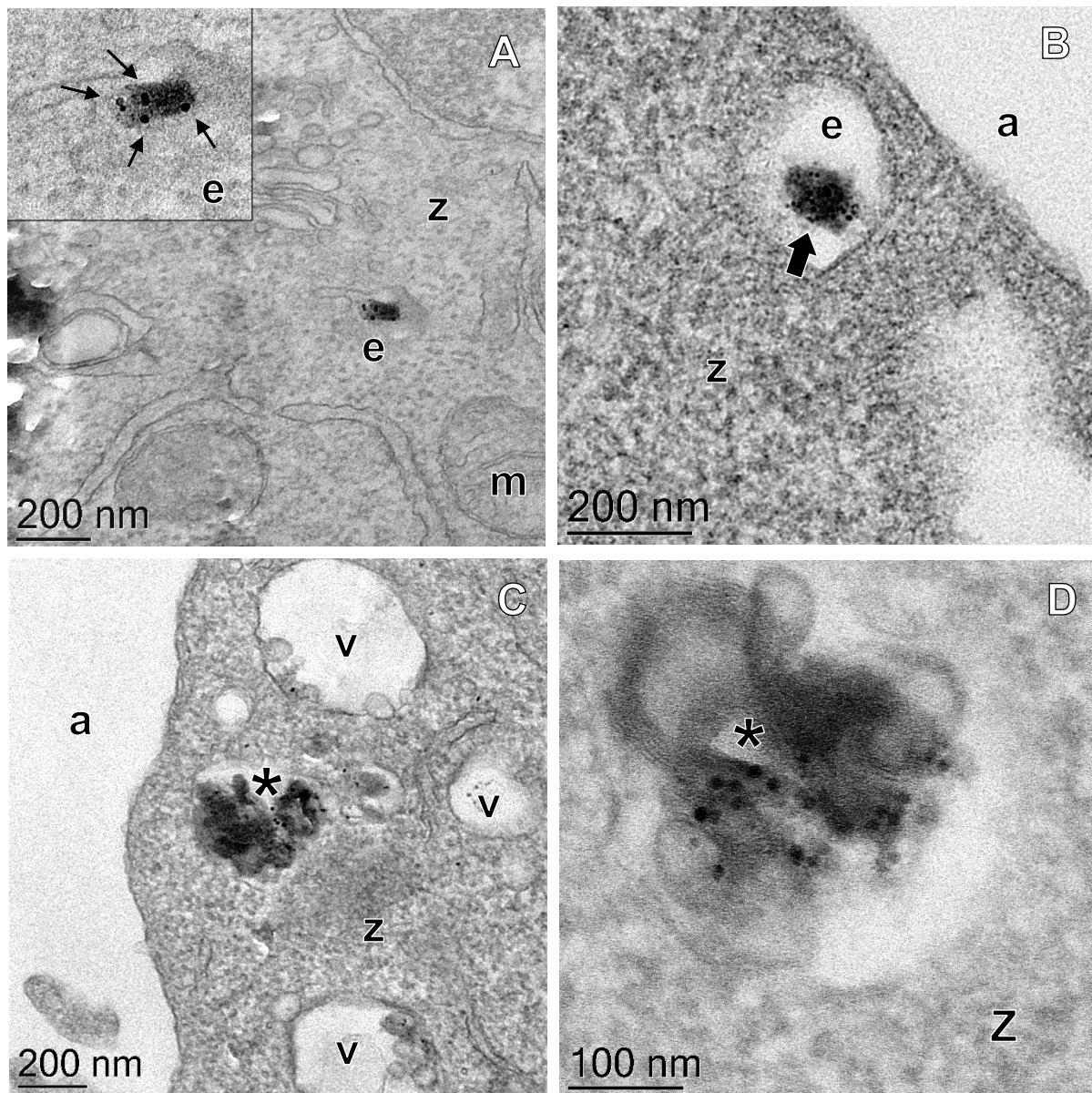


Abbildung 39: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS12 Nanosternen

Es wurden Polyplexe aus pEGFP-N1 und NS12 (N/P = 20) gebildet, in getrennten Ansätzen zu CHO-K1 Zellen gegeben und das Transfektionsmedium zu unterschiedlichen Zeiten ausgetauscht: Nach 30 min (A), nach 1 h (B) oder nach 4 h (C, D). Anschließend wurden die Zellen gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert (A – C).

Gezeigt sind ein Endosom mit eingeschlossener Polyplex-Struktur (A, B), und MVB-artige Strukturen mit assoziierten Nanopartikeln (C, D). Markierte Strukturen: Nanopartikel (schlanker Pfeil), Mitochondrium (m), Zytoplasma (z), MVB-Strukturen mit Nanopartikeln (*), Endosom mit Polyplex (e), Vesikel (v), Bereich außerhalb der Zelle (a), Polyplexe (dicker Pfeil). Berechneter Durchmesser der Polyplexe: B: 148 nm.

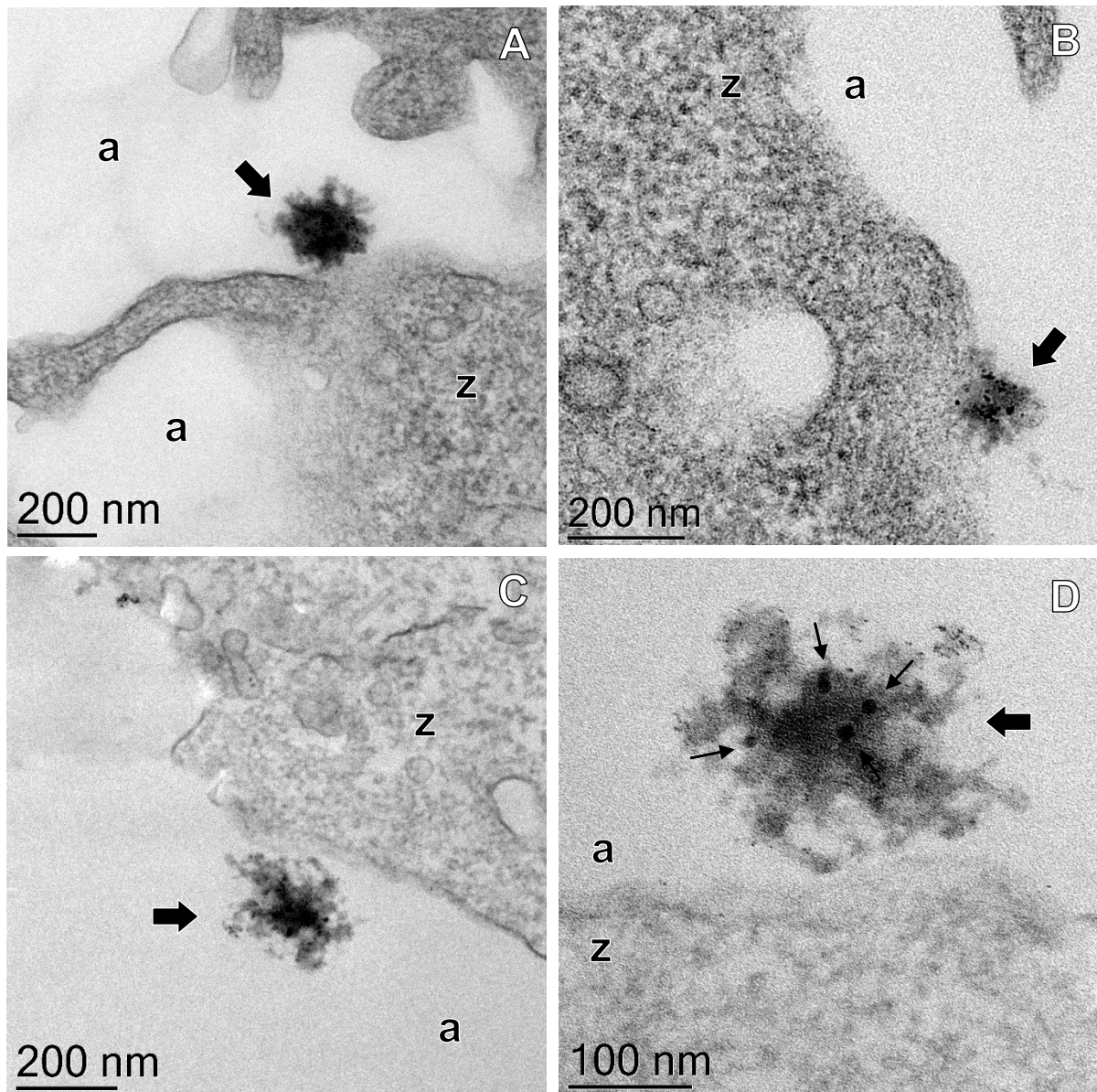


Abbildung 40: TEM Aufnahmen von NS12 Polyplexen mit CHO-Zellen

Es wurden Polyplexe aus pEGFP-N1 und NS12 (N/P = 20) gebildet, zu CHO-K1 Zellen gegeben und das Transfektionsmedium nach 1 h ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen direkt gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert. Gezeigt sind Polyplex-Strukturen an der Außenseite der Zellmembran, Aufnahme D stellt eine Vergrößerung der auf Aufnahme C gezeigten Struktur dar. Markierte Strukturen: Nanopartikel (schlanker Pfeil), Polyplexe (dicker Pfeil), Mitochondrium (m), Zytoplasma (z), Bereich außerhalb der Zelle (a). Berechneter Durchmesser der Polyplexe: A: 261 nm, B: 159 nm, C: 268 nm, D: 274 nm.

5.2.5 Detektion der Nanosterne über Elektronenenergieverlust-spektroskopie

Der elektronendichte Maghemit-Kern ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ermöglicht die Analyse der Nanosterne per Transmissionselektronenmikroskopie. Während die Detektion bei Polymerlösungen problemlos ist und die einzelnen Nanopartikel auf den Aufnahmen gut zu erkennen sind (Abbildung 31), erfordern biologische Proben wie Gewebe oder Zellpellets die Nachkontrastierung mit Chemikalien wie beispielsweise Osmiumtetroxid oder Bleicitrat. Dadurch werden biologische Strukturen wie Biomembranen oder Zellorganellen sichtbar, allerdings führt diese Präparierung auch zu einem größeren Hintergrundrauschen. Bei Aufnahmen mit einem hohen Kontrast sind dadurch einzelne Nanopartikel teils optisch nur schwer vom Hintergrund der Probe zu unterscheiden. Da Strukturen mit einem vergleichbaren elementaren Aufbau und Zusammensetzung wie die $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikel in Zelllinien wie CHO-K1 nicht vorkommen, könnte eine Analyse der elementaren Zusammensetzung der Aggregate helfen, die Nanopartikel vom nachkontrastierten biologischen Material zu unterscheiden. Eine Methode, um die Verteilung eines bestimmten Elements, in diesem Fall Eisen, in einer Probe nachzuweisen, stellt die Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) dar. Zu diesem Zweck wurden von präparierten CHO-Zellen, die mit den Nanosternen NS2 transfiziert wurden (Vergleiche Kapitel 5.2.3), Aufnahmen angefertigt und mittels der 3-Fenster-Methode ein Elemental Mapping von Eisen angefertigt um zu untersuchen, ob sich diese Methode dazu eignet, um die Nanopartikel innerhalb der Zelle zu lokalisieren. In Abbildung 41 A ist das normalisierte Energieverlustspektrum der Eisen $L_{2,3}$ -Ionisierungskante, in Abbildung 41 B und C die TEM-Aufnahmen von intrazellulären Nanosternen Ansammlungen und die dazugehörige elementare Verteilung von Eisen gezeigt.

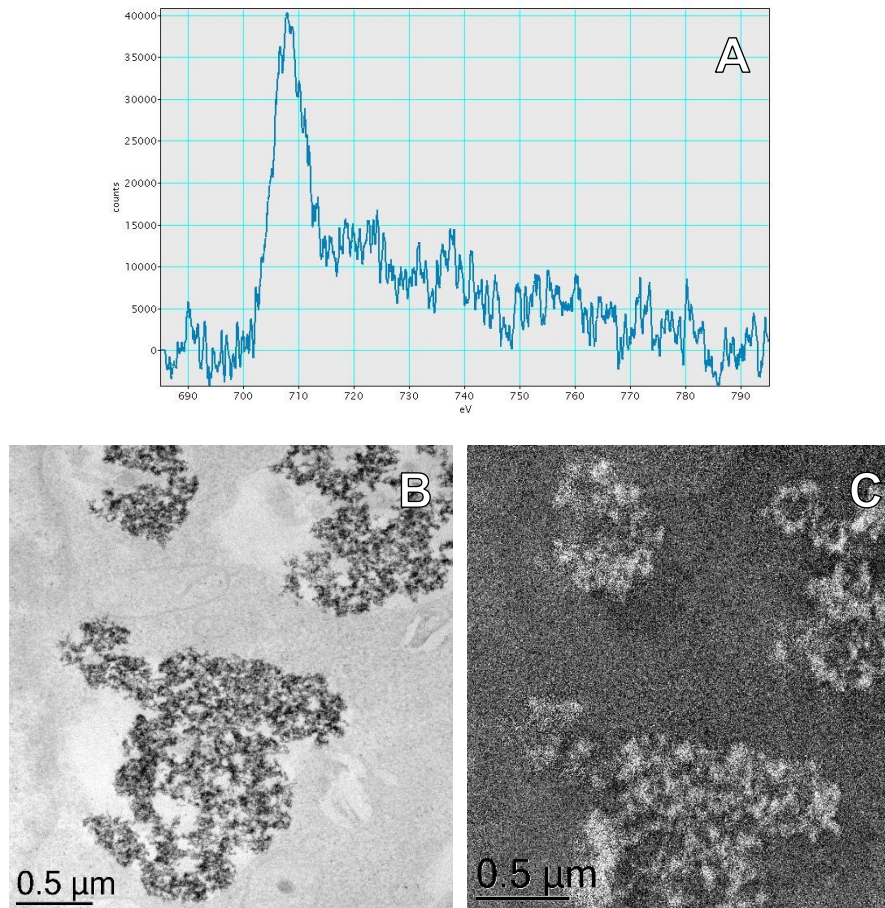


Abbildung 41: Elektronenenergieverlustspektroskopie-Analyse der intrazellulären Eisenverteilung

CHO-K1 Zellen wurden mit Polyplexen aus pEGFP-N1 und NS2 (N/P = 10) transfiziert und nach 26h Inkubationszeit gemäß des TEM-Präparationsprotokolls fixiert. A: Energieverlustspektrum im Bereich der Eisen $L_{2,3}$ -Kante (~ 712 eV), B: TEM-Aufnahme von Nanostern-Aggregationen, C: Elemental Mapping von Eisen (helle Bereiche, die Position entspricht der Aufnahme von B).

Das Energieverlustspektrum zeigt ein hohes Hintergrundrauschen nach der Eisen-Kante. Die Fe- L_3 Kante im Bereich ~ 710 eV ist deutlich zu sehen, die Fe- L_2 Kante im Bereich von ~ 720 eV wird etwas vom Hintergrundrauschen überdeckt. Die Lage der Eisen-Kanten im Energieverlustspektrum deckt sich dabei mit den Daten der Literatur, die für andere γ - Fe_2O_3 Nanopartikel berichtet wurden.^{222,223} Das Hintergrundrauschen macht sich auch in der Abbildung der elementaren Verteilung von Eisen bemerkbar (Abbildung 41 C). Der Kontrast ist etwas gering und die Eisenverteilung erscheint eher diffus. Darüber hinaus scheint ein leichter Drift der Probe stattgefunden zu haben, erkennbar am Schatten unterhalb der hellen Bereiche der Fe-Verteilung. Für eine Identifizierung von einzelnen Nanopartikeln ist die Methode vermutlich nicht sensitiv

genug, für diesen Zweck sollten moderne Verfahren wie STEM (engl. *scanning transmission electron microscopy*) angewendet werden.²²⁴ Dennoch entsprach das Elemental Mapping von Eisen weitestgehend der TEM-Aufnahme der Nanostern-Aggregationen und könnte daher für Präparate verwendet werden, bei denen durch die Nachkontrastierung ein hohes Hintergrundrauschen oder viele kontrastreiche Bereiche erhalten wurde, beispielsweise im Bereich des Zellkerns.

6. Zusammenfassung

Der Transfer genetischen Materials in Säugerzellen („Transfektion“) ist von großer Bedeutung für die Erzeugung genetisch modifizierter Zellen und kann heute mit verschiedenen Techniken bewerkstelligt werden. Bei der nicht-viralen Transfektion werden synthetische Vektoren (z.B. polykationische Polymere) eingesetzt, um das genetische Material (z.B. Plasmid-DNA) zu binden und in Form von sogenannten Polyplexen in die Zelle zu schleusen. Über die Mechanismen der Aufnahme der Polyplexe und die Freisetzung der DNA im Zellinneren ist jedoch bislang nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neuartige sternförmige Nanopartikel vorgestellt, die sich zur Transfektion von Säugerzellen eignen. Diese "Nanosterne" bestehen aus einem festen $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Kern, der mit einer Silica-Hülle beschichtet und via Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) mit Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat (PDMAEMA) funktionalisiert wurde. Durch den Eisenoxid-Kern sind die Nanosterne paramagnetisch. Eine Bibliothek dieser Nanosterne, bei der sich die einzelnen Varianten hauptsächlich in Anzahl und Länge der PDMAEMA-Arme unterscheiden, wurde mit verschiedenen physikochemischen Methoden charakterisiert und die Transfektion von verschiedenen Säugerzellen untersucht. Die gebildeten Polyplexe aus Nanosternen und pDNA wurden auf ihre Größe und Oberflächenladung über Bestimmung des Zetapotentials und dynamischer Lichtstreuung (DLS) charakterisiert. Die Ladung der Polyplexe korrelierte mit dem N/P-Verhältnis (Molverhältnis der Polymer-Aminogruppen zu den Phosphatgruppen der DNA) und erreichte je nach Nanostern ab einem N/P-Verhältnis ≥ 15 einen Sättigungswert von 15 bis 22 mV. Auch die Größe der Polyplexe zeigte eine Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis, wobei eine Erhöhung von letzterem bis zu einer Sättigungsgrenze zu einer Verkleinerung der hydrodynamischen Radien führte. Eine

Ausnahme bildeten die Nanosterne mit der kleinsten Armdichte, bei denen Aggregationsbildung beobachtet wurde. Der Grund liegt vermutlich in der geringeren elektrostatischen und sterischen Abstoßung der Nanosterne. Die Stabilität der Polyplexe wurde mit dem ΔT -Assay untersucht. Dabei zeigten Polyplexe in HBG-Lösung mit steigenden N/P-Verhältnis eine höhere Stabilität als in NaCl-Lösung (150 mM). Als Ursache könnte ein pH-Effekt, der zu einer Veränderung der Ladungsdichte führt, in Betracht kommen. Diese Hypothese wurde durch zusätzliche pH-Messungen bestärkt.

Für die Transfektionsstudien wurden Polyplexe aus verschiedenen Varianten der Nanostern-Bibliothek und einem Plasmid, welches für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, gebildet und verschiedene Zelllinien transfiziert (CHO-K1, HEK-293, L929, Jurkat). Transfektionseffizienz und Zytotoxizität korrelierten mit dem N/P-Verhältnis und der Architektur der Nanosterne, wobei die Vertreter mit einer Armdichte von $\sim 0,06$ Ketten/nm² die besten Transfektionsergebnisse zeigten. Des Weiteren wurde der zelluläre Magnetismus untersucht: Mit Nanosternen assoziierte Zellen zeigten magnetische Eigenschaften und konnten durch das Anbringen eines Magnetfeldes von den übrigen Zellen abgetrennt werden. Dabei wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Zahl an magnetischen Zellen und der Transfektionseffizienz beobachtet. Auffällig war dabei der hohe Anteil magnetischer Zellen bei der Transfektion mit Nanosternen mit einer geringen Armdichte. Modifizierung der PDMAEMA-Arme mit zusätzlichen äußeren PDEGMA-Blöcken führte in Transfektionsexperimenten zu einer verbesserten Serumkompatibilität gegenüber den unmodifizierten Varianten.

Im letzten Teil der Arbeit wurden CHO-K1 Zellen mit verschiedenen Vertretern der Nanostern-Bibliothek transfiziert und in Abhängigkeit von der Kinetik der Interaktion zwischen Zelle und Nanostern für die Dokumentation per TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) präpariert und chemisch fixiert. Dabei konnten für alle untersuchten Nanostern-Varianten intrazelluläre Aggregationen auf den TEM-Aufnahmen lokalisiert werden. Auffällig war dabei die Co-Lokalisation mit multivesikulären Strukturen (MVBs; „multivesicular bodies“), bei denen es sich vermutlich um späte Endosomen oder Heterolysosomen handelte. Es wurden keine freien Nanopartikel im Zytoplasma oder im Zellkern gefunden. Darüber hinaus wurde demonstriert, wie die Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) die

Unterscheidung von Nanopartikeln und kontrastiertem biologischem Material ermöglicht.

7. Summary

The transfer of genetic material into mammalian cells ('transfection') is a vital tool for the generation of genetically modified cells. Nowadays, a variety of techniques exist to achieve the latter. Non-viral transfection involves the utilization of synthetic vectors, e.g. polycationic polymers, to condense the genetic material (e.g. plasmid DNA) via electrostatic interaction into complexes, referred to as 'polyplexes'. After particle formation, the polyplexes can enter the cells via endocytosis. However, the mechanisms of cellular uptake and intracellular release of the DNA are poorly understood so far.

The scope of this work focused on novel star-shaped nanoparticles, referred to as 'nanostars', which are suitable for non-viral transfection of mammalian cells. The structure consists of a solid paramagnetic silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ core, which has been functionalized with Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylate (PDMAEMA) via atom transfer radical polymerization (ATRP). A library of highly homogeneous, paramagnetic nano-star polycations with varied arm lengths and grafting densities was characterized using different physico-chemical techniques and was used to conduct transfection studies in several mammalian cell lines. Size and surface charge of polyplexes formed with nanostars and pDNA were determined by measurement of the zeta potential and dynamic light scattering (DLS), indicating a correlation of polyplex charge with the N/P ratio (polymer nitrogen/DNA phosphorus). For N/P ratios ≥ 15 , the polyplex charge reached a plateau of 15 – 22 mV. Polyplex size measurements indicated a correlation with the N/P ratio as well. Increasing the latter resulted in smaller hydrodynamic Radien, with the only exception in the case of the nanostars with the lowest grafting density, which showed aggregate formation. The polyplex stability was assessed with the ΔT assay. It was shown, that at high N/P ratios polyplexes in HBG solution have an increased stability over polyplexes formed in NaCl solution (150 mM). Additional pH measurements indicated a pH effect that leads to an alteration in the charge density.

Transfection studies were conducted in different cell lines (CHO-K1, HEK-293, L929 and Jurkat) by formation of polyplexes with different variants of the nanostar library and a plasmid coding for the green fluorescent protein (GFP). Transfection efficiencies and cytotoxicity varied systematically with the nano-star architecture and the N/P ratio. The arm density was particularly important, with values of approximately 0.06 arms/nm² yielding the best results. Additionally, the cellular magnetism was examined as well: Cells with associated nano-stars became magnetic and could be separated from the non-magnetic cell population via application of an external magnetic field. No statistical significant correlation was found between the gene delivery potential of a nano-star and its ability to render the cells magnetic. However, a clear trend was observed for transfections with low grafting density nano-stars, which resulted in a high proportion of magnetic cells. Furthermore, end-capping the PDMAEMA-arms with PDEGMA blocks (Poly(di(ethylene glycole)methyl ether methacrylate) showed significantly improved serum compatibility under transfection conditions.

In the last chapter of the thesis, CHO-K1 cells were transfected with the nano-star library and fixed chemically after varied incubation times for TEM (transmission electron microscopy). Intracellular aggregations were observed and documented for all examined nano-stars. Interestingly, the nanostars colocalized with MVBs ("multivesicular bodies"), presumably late endosomes or heterolysosomes. No free nanoparticles were found in the cytoplasm or in the cell nucleus. Furthermore it was demonstrated, how the electron energy loss spectroscopy (EELS) enabled the discrimination between nanoparticle aggregations and contrasted biological structures of the sample.

8. Anhang

8.1 Zusätzliche Ergebnisse

8.1.1 Größenbestimmung der Nanosterne über DLS

Es wurden die hydrodynamischen Radien der Nanosterne in wässriger Lösung und in Opti-Mem bestimmt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Größe der Nanosterne in verschiedenen Lösungsmitteln

Nanosterne		R_h (nm)	
Bezeichnung	Grafting Density	H ₂ O	Opti-MEM
NS1	0,006	120,5 ± 1,1	230,7 ± 9,1
NS2	0,011	96,5 ± 2,4	119,6 ± 13,7
NS3	0,024	156,7 ± 2,4	156,1 ± 7,6
NS4	0,035	-	160,2 ± 1,5
NS5	0,054	228,2 ± 50,8	118,5 ± 17,1
NS6	0,064	142,4 ± 8,8	102,2 ± 1,2
NS7	0,1	37,1 ± 1,6	70,9 ± 10,8
NS8	0,149	17,0 ± 4,3	-
NS9	0,182	21,7 ± 4,9	34,2 ± 12,7
NS10	0,289	92,2 ± 51,2	-
NS11	0,291	25,8 ± 5,1	83,0 ± 14,8
NS12	0,3	118,3 ± 6,1	-

Gezeigt sind die per DLS-Messung im Zetasizer bestimmten hydrodynamischen Radien (R_h) der Nanosterne in H₂O oder serumfreiem Kulturmedium (Opti-MEM). Nicht vorgenommene Messungen wurden mit "-" markiert.

In wässriger Lösung wurden hydrodynamischen Radien der Nanosterne in einem breiten Bereich von 17 ± 4 nm (NS11) bis 228 ± 51 nm (NS5) gemessen. In Opti-MEM waren der kleinste gemessene Radius 34 ± 13 nm (NS9), der maximale Radius betrug 231 ± 9 nm (NS1).

8.1.2 Einfluss des Transfektionsprotokolls

Es wurden Polyplexe aus dem Nanostern NS5 und dem Plasmid EGFP-N1 gebildet und L929-Zellen jeweils nach dem ursprünglichen und adaptierten Protokoll transfiziert (Abbildung 42).

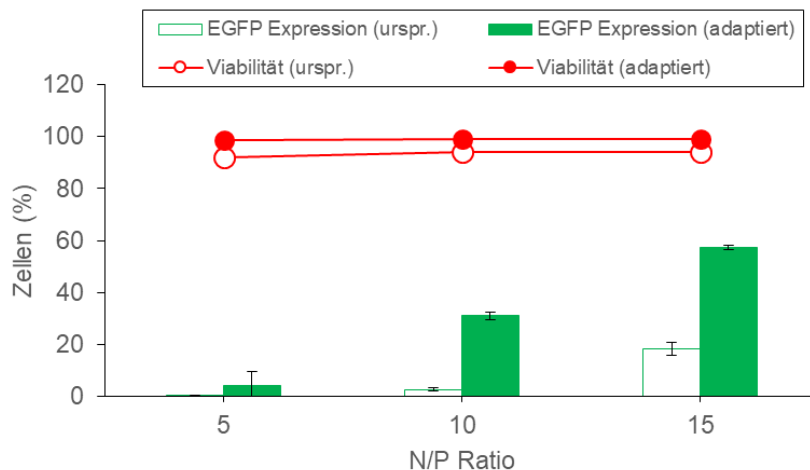


Abbildung 42: Transfektion von L929 Zellen, abhängig von der N/P-Ratio und dem verwendeten Protokoll

Es wurden Polyplexe mit NS5 und dem Plasmid EGFP-N1 bei Raumtemperatur entweder nach dem ursprünglichen (Symbole ohne Füllung) oder dem adaptierten (ausgefüllte Symbole) Protokoll gebildet und nach 30 min Inkubationszeit zu adhären L929 Zellen gegeben. Nach 27h Inkubationszeit wurde die EGFP-Expression (grün) und die Viabilität (rot) per Durchflusszytometrie bestimmt. V1: 1 µg pDNA werden mit 150mM wässriger NaCl-Lösung zu einem finalen Volumen von 200 µl angesetzt. Anschließend Zugabe der Nanosterne und vortexen. V2: 1 µg pDNA werden in 50 µl von 150 mM NaCl-Lösung gelöst und mit 1 ml Opti-MEM Transfektionsmedium vermischt. Anschließend Zugabe der Nanosterne und vortexen. Die unterschiedlich gebildeten Polyplexe wurden schließlich zu den Zellen gegeben. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, $n \geq 2$.

Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Transfektionseffizienz zwischen beiden Protokollen. Während bei der Verwendung des adaptierten Transfektionsprotokolls bis zu 57% transfizierte Zellen erhalten wurden, waren es bei dem ursprünglichen nur ca. 18%. Die Viabilität war stets etwa 5% geringer, aber mit $\geq 92\%$ noch akzeptabel.

8.2 Material & Methoden

8.2.1 Verwendete Materialien und Geräte

8.2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, aus dem Angebot von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland). Ausnahmen:

Agarose (Molecular Grade)

Bioline (Luckenwalde, D)

Bromphenolblau	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
EDTA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
EMbed 812	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)
Ethanol	VWR (Briare, F)
Glutaraldehyd (Grade I, 25 %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
HEPES ($\geq 99,5$ %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamin (200 mM)	PAA (Pasching, A)
MTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Propylenoxid (min 99,9 %)	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
UHU plus endfest 300	Uhu GmbH & Co. KG (Bühl, D)
2-K-Epoxidharzkleber	
Uranylacetat (98 %)	PolyScience (Niles, IL, USA)

8.2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Digitalkamera DC 290 Kodak	(Rochester, NY, USA)
Durchflusszytometer FC 500	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Flockeneisbereiter AF 100	Scotsman (Vernon Hills, IL, USA) ⁵⁰
Fluoreszenzmikroskop BX51	Olympus (Hamburg, D)
Gelphotoapparatur EDAS 290	Kodak (Rochester, NY, USA)
Heraeus BIOFUGE pico	Thermo Electro Corporation (Hamburg, D)
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Electro Corporation (Hamburg, D)
Horizontalelektrophoresekammer für Agarosegele Typ E-H1, E-H2	Febikon Labortechnik GmbH (Wermelskirchen, D)
Lichtmikroskop CKX41SF	Olympus (Hamburg, D)
Life Science UV/Vis	Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)

Spectrophotometer DU © 530

Tecan GENios Microplate Reader Tecan Group AG (Männedorf, CH)

Mikrowelle MS-2622E LG Electronics Deutschland GmbH (Ratingen, D)

Millipore-Anlage Synergy 185 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)

pH-Meter MP220 Mettler-Toledo GmbH (Urdorf, CH)

Pipetten Eppendorf AG (Hamburg, D)

Spannungsquelle E835 Consort (Turnhout, BE)

Sterilbank Mobilien W 90 Waldner (Wangen, D)

ThermoForma Steri-Cult CO₂ Inkubator Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)

Thermomixer comfort Eppendorf AG (Hamburg, D)

Ultra 35° Diamantmesser (3 mm DiATOME AG (Biel, CH)

Messerbreite)

Ultramikrotom EM UC7 Leica Microsystems (Wetzlar, D)

Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

Vortex Genie 2 Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)⁵¹

Waage Explorer E0B120 Ohaus Corporation (Parsipanny, NJ, USA)

Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments (Malvern, UK)

8.2.1.3 Enzyme und Seren

FCS PAA (Pasching, A)

Penicillin / Streptomycin (100x) PAA (Pasching, A)

Trypsin-EDTA (1x) PAA (Pasching, A)

8.2.1.4 Puffer- und Medienzusammensetzung

Dulbecco's PBS (1x; ohne Ca & Mg)	PAA (Pasching, A)
HBG Puffer 0,5%	20 mM Hepes, 0,5 wt% Glukose, pH 5,5
HBG Puffer 5%	20 mM Hepes, 5 wt% Glukose, pH 5,5
MEM (mit Phenolrot)	PAA (Pasching, A)
MEM (ohne Phenolrot)	PAA (Pasching, A)
MEM-Kulturmedium	MEM; 10 % v/v FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin; 100 IU/ml Penicillin
MTT-Lösung	MTT (1 mg/ml) in phenolrot-freiem MEM
OPTI-MEM (+ GlutaMAX)	Reduziertes Serum Medium (Invitrogen/Life Technology/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
R10	RPMI 1640; 10 % v/v FCS, 100 µg/ml Streptomycin; 100 IU/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin, mit Phenolrot)	PAA (Pasching, A)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris; 50mM EDTA; 1 M Essigsäure, pH = 8,5
Fixierungspuffer für TEM-Präparierung	0,1 M HEPES, 4 mM CaCl ₂ , 2,5% Glutaraldehyd, pH 7,2
Waschpuffer für TEM-Präparierung	0,1 M HEPES, 4 mM CaCl ₂ , pH 7,2

8.2.1.5 Plasmide

pEGFP-N1 Vector Information

GenBank Accession #U55762

PT3027-5

Catalog #6085-1

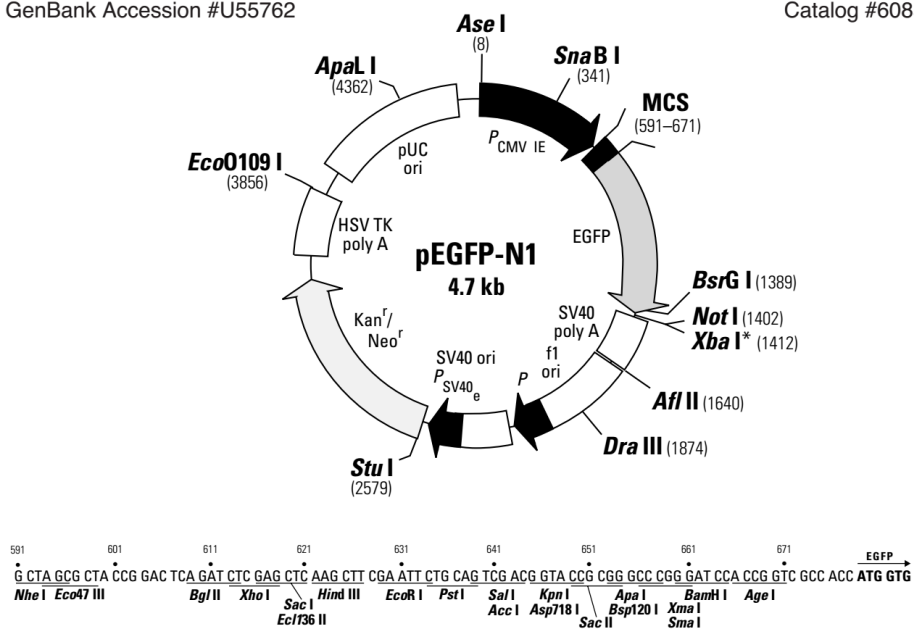


Abbildung 43: Restriktionskarte und Multiple Cloning Site (MCS) des pEGFP-N1 Vektors

© 1999, CLONTECH Laboratories, Inc.

pZsYellow1-N1 Vector Information

PT3483-5

Cat. No 632445 and sold as part of Cat. No. 630050

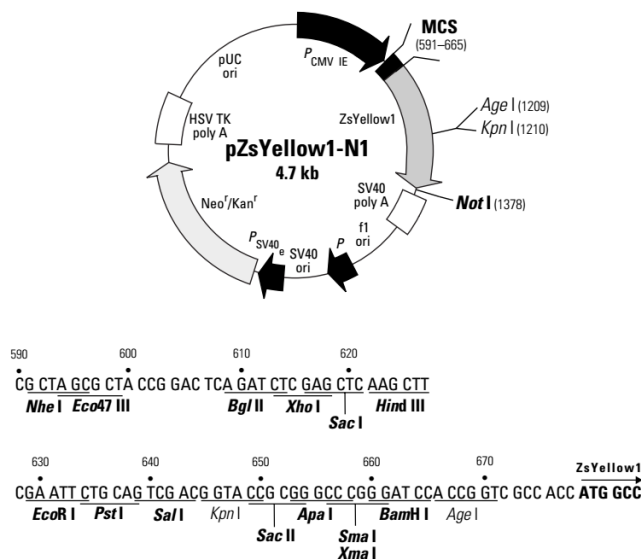


Abbildung 44: Restriktionskarte und Multiple Cloning Site (MCS) des pZsYellow1-N1 Vektors

© 2005, CLONTECH Laboratories, Inc.

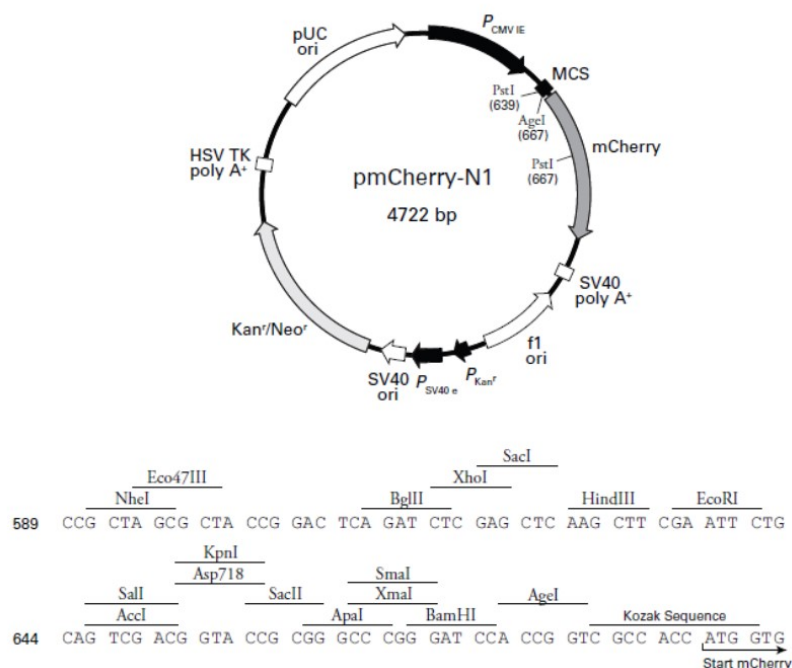


Abbildung 45: Restriktionskarte und Multiple Cloning Site (MCS) vom pmCherry-N1 Vektor

© 2008 CLONTECH Laboratories, Inc

8.2.1.6 Sonstige Materialien und Verbrauchsgegenstände

22 x 22 mm Deckgläser (Dicke: VWR International (Radnor, PA, USA)

0,19 mm)

Aclar® Film Honeywell International (Morristown, NJ, USA)

Coplin Färbeglas Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)

Färbegestell für Deckgläser Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)

Kapillarzelle DTS1061 Malvern Instruments (Malvern, UK)

LS MACS-Säule Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)

MidiMACS™ Separator Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)

Parafilm Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)

Pipettenspitzen Brand GmbH (Wertheim, D)

8.2.2 Verwendete PDMAEMA-basierte Nanosterne

Alle der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sternförmigen PDMAEMA-basierten kationischen Polymere wurden von Dr. Alexander P. Majewski (Lehrstuhl Makromolekulare Chemie II, Uni Bayreuth) synthetisiert und charakterisiert.

Die Synthese der Maghemit (Fe_2O_3)-Nanopartikel erfolgte entsprechend Majewski et. al (2012). Den Eisenkernen wurde eine Silica-Hülle aufgelagert²²⁵ und über Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)⁶⁹ via „grafting from approach“⁷⁴ mit PDMAEMA bestückt. Der Silica-Hülle war hierfür zuvor ein ATRP-Initiator aufgebracht (2-Bromisobutyryl-6-(trichlorosilyl)hexanoat, BIBSI) worden. Der Unterschied dieser Nanopartikel, gegenüber den in Majewski et. al (2012)⁷⁰ vorgestellten, liegt im Wesentlichen in der Silica-Hülle, die eine kovalente Verknüpfung der PDMAEMA-Arme mit dem Maghemit-Kern ermöglicht. Für Details der Synthese siehe Majewski et. al (2012)⁷⁰ und Majewski et. al (2013)¹⁵⁷.

Für die Berechnung der Armlängen sowie –Anzahl wurden die Messdaten der Thermogravimetrischen Analyse (TGA) und der Durchmesser der Partikel (per Transmissionselektronen-Mikroskopie und Größenausschluss-Chromatographie (Size

Exclusion Chromatography, SEC) bestimmt) verwendet. Die Messung des Polydispersitätsindex (PDI) erfolgte mittels DMAc-SEC (Kalibrierung mit PDMAEMA).

8.2.3 Charakterisierung der DNA-Polymer Komplexbildung

8.2.3.1 Messungen im Zetasizer

Die Messung der Partikelgröße durch DLS (=dynamische Lichtstreuung) wurde mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern) durchgeführt. Die Bedingungen der Polyplex-Bildungen entsprachen denen der Transfektion; zuerst wurde 1 µg pEGFP in 50 µl NaCl (150 mM) vorgelegt, anschließend 1 ml Opti-MEM (Gibco) vermischt und schließlich abhängig vom gewählten N/P-Verhältnis die entsprechende Menge an Nanopartikel zugegeben. Nach der 30-minütigen Inkubation im 1,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur wurde 1 ml der Polyplex Lösung in eine Halbmikro-Küvette überführt (Brand, Wertheim, Deutschland; aus Polystyrol zum Einmalgebrauch). Für die Bestimmung der Partikelgröße der gebildeten Polyplexe diente die Messung der dynamischen Lichtstreuung via nichtinvasiver Rückstreuung (Non-Invasive Back-Scatter, NIBS). Dies wurde mit einem He-Ne Laser (633 nm, max. 5 mW) bei 25 °C, wenn nicht anders angegeben, durchgeführt.

8.2.3.2 ΔT Assay

1 µg pDNA wurden mit SYBR green I vermischt (finale Konzentration: $2,5 \cdot 10^{-5}$ der Stocklösung) und in einem finalen Volumen von 50 µL an 150 mM NaCl- oder HBG-Lösung für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde eine ausreichende Menge der Polykation-Stocklösung zugegeben, um das gewünschte N/P-Verhältnis zu erreichen. Die Mischung wurde für 10 s gevortexed und für weitere 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Proben wurde anschließend in Real Time PCR Röhrchen gegeben und in eine Real Time PCR Maschine überführt (MX3005P, all Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), welche mit einem SYBR green Filter ausgestattet war (BP 504 ± 12 nm). Die Temperatur wurde dabei von 25 auf 95 °C mit einer Rate von 1 °C / min erhöht. Die Schmelztemperatur der DNA wurde als der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve der relativen SYBR green Fluoreszenz

(Fluoreszenz bei einer gewählten Temperatur relativ zu der Fluoreszenz der Starttemperatur $T = 25\text{ °C}$) als Funktion der Temperatur definiert.

8.2.4 Zellbiologische Methoden

8.2.4.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung der CHO-K1 (CCL-61, American Type Culture Collection (ATCC) (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland), HEK-293 (CRL-1573, ATCC) und Jurkat-Zellen (menschliche Leukämie T-Zellen, TIB-152, ATCC) erfolgte in Polystyrol-beschichteten 96 mm Kulturschalen mit 10 ml R10-Medium (RPMI 1640, 10 % v/v FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin), die L929-Zellen (Mausfibroblasten, CCL-1, ATCC) wurden in M10-Medium (MEM, 10 % v/v FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 4 mM L-Glutamin) kultiviert. Alle zwei bis drei Tage bei Erreichen von ungefähr 80 % Bewachungsgrad wurden die adhärenenten Zellen (CHO-K1, HEK-293 und L929) mit DPBS gewaschen, durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA (1x, PAA, Pasching, Österreich) nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur losgelöst und in frischem Kulturmedium verdünnt. Die Suspensions-Zellen (Jurkat) wurden ohne Trypsinierung geerntet, per Vi-Cell Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) ausgezählt und entsprechend in frischem Kulturmedium verdünnt. Während der Inkubationsphase wurden die Zellen in einem Inkubator bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Um die adhärenenten Zellen für die Analysen zu gewinnen, wurde zuerst das Medium mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt, welche über einen Schlauch an eine Vakuumpumpe angeschlossen war und in einem Reservoir gesammelt. Anschließend wurde die Platte zwei Mal mit je 5 ml DPBS (6-well-Platten: 2 ml) gewaschen, um freie Proteine und Serumreste zu entfernen. Für das Ablösen der Zellen wurde 1 ml Trypsin-EDTA (6-well-Platten: 0,5 ml) hinzugegeben und die Platte leicht geschwenkt, so dass die Oberfläche gleichmäßig bedeckt ist. Haben sich nach ungefähr 10 - 15 min Inkubationsdauer die Zellen abgelöst, wurde die Platte noch sanft gegen die Arbeitsbank geklopft um sicher zu stellen, dass sich alle Zellen losgelöst haben, 5 ml Kulturmedium hinzugegeben, gut durchmischt und die Zellen resuspendiert.

8.2.4.2 Transfektion von Säugerzellen mit kationischen Polymeren

Das Protokoll für die Transfektion von adhärenenten Zellen basiert auf der Methode nach Schallon et al. (2010).¹⁶ Es zeigte sich, dass für die neu synthetisierten Nanopartikel mit Silica-Hülle aufgrund erhöhter Zytotoxizität eine Anpassung des Transfektionsprotokolls nötig war. Die Änderungen wurden insbesondere beim Schritt der Polyplex-Bildung vorgenommen: Eine Erhöhung des Volumens der Inkubationslösung (von 50 µl auf 1 ml) und die Inkubation direkt in Opti-MEM Kulturmedium begünstigten dabei eine erfolgreiche Transfektion bei geringer Zelltoxizität. Das Schema des ursprünglichen Polyplex-Inkubationsprotokolls ist in Abbildung 46 gezeigt, das adaptierte Protokoll ist in Abbildung 47 aufgeführt.

Für die Transfektion wurden adhärente CHO-K1, L929 oder HEK-293 Zellen oder Jurkat-Suspensionszellen am Vortag (ca. 20 h vor der eigentlichen Transfektion) bei einer Zelldichte von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Kulturmedium pro well in 6-well-Platten angesetzt. Die Zellzählung und Bestimmung der Viabilität erfolgte im Vi-Cell Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, Viabilität > 90 %) über Trypanblau-Messung. Anschließend wurden die Zellen über Nacht unter den Standard-Kultivierungsbedingungen (siehe Stammhaltung) inkubiert. Am Tag danach wurde bei den adhärenenten Zellen vor der Transfektion das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml DPBS gewaschen und in 1 ml Opti-MEM für 1 Stunde vorequibriert. Die Suspensionszellen wurden vorher noch zentrifugiert (5 min, 200 g), und das Pellet anschließend analog zum Vorgehen der adhärenenten Zellen zweimal jeweils mit 2 ml DPBS gewaschen und die Zellen in 1 ml Opti-MEM resuspendiert und für 1 Stunde vorequibriert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Polyplexe: Dazu wurden 1 µg pEGFP-N1 Plasmid (4.7 kb; Clontech; für Vektorkarte siehe Anhang Abbildung 43) in 50 µl wässriger NaCl-Lösung (150 mM) vorgelegt, mit 1 ml Opti-MEM vermischt und abhängig vom gewünschten N/P-Verhältnis die entsprechende Menge des gewählten kationischen Polymers zugegeben, 10 Sekunden gevortext und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der Polyplex-Lösung wurden die Platten für 3 bis 4 Stunden inkubiert (Inkubator; 37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit). Danach wurde das Medium abgesaugt, durch 2 ml R10-Medium (M10-Medium bei L929-Zellen) ersetzt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet (siehe Kapitel 8.2.4.1 Stammhaltung) und in je 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen

wurden in „FACS-Röhrchen“ übertragen, zentrifugiert (5 min, 200 g) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde schließlich in DPBS resuspendiert und mit Propidiumiodid versetzt (1 µg / ml), um tote Zellen bei der darauf folgenden Messung im Durchflusszytometer zu identifizieren. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte durch Analyse in einem Cytomics FC500 Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), welches mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser ausgestattet war, über die Messung der relativen EGFP Fluoreszenz von $2 \cdot 10^4$ Zellen (falls Zellzahl nicht ausreichend: bei einer Messdauer von 300 Sekunden). Die verwendeten Filter waren ein 525 BP (Band-pass) für EGFP und ein 620 BP für Propidiumiodid. Dabei diente das EGFP-Signal als Marker für die Transfektion und das Propidiumiodid-Signal als Marker für tote Zellen bei der Bestimmung der Vitalität. Für den Dot-Plot wurde das Vorwärtsstreulicht (FS, front scatter) auf die X-Achse gelegt und das Seitwärtsstreulicht (SS, side scatter) auf die Y-Achse (siehe Abbildung 48 A). Die nicht-aggregierten und nicht-apoptotischen Einzelzellen wurden dann per Gate im FS/SS-Plot ausgewählt und in einem neuen Dot-Plot dargestellt: Hier wurde das Propidiumiodid-Signal (X-Achse) gegen das EGFP-Signal (Y-Achse) aufgetragen und der Plot in vier Regionen aufgeteilt (siehe Abbildung 48 B, C1 - C4). In Region C1 liegen somit die lebenden transfizierten Zellen mit EGFP-Signal, in C2 die Zellen mit EGFP- und Propidiumiodid-Signal (also transfiziert und tot), in C3 die Zellen ohne EGFP oder Propidiumiodid-Signal und in C4 die toten Zellen mit Propidiumiodid-Signal.

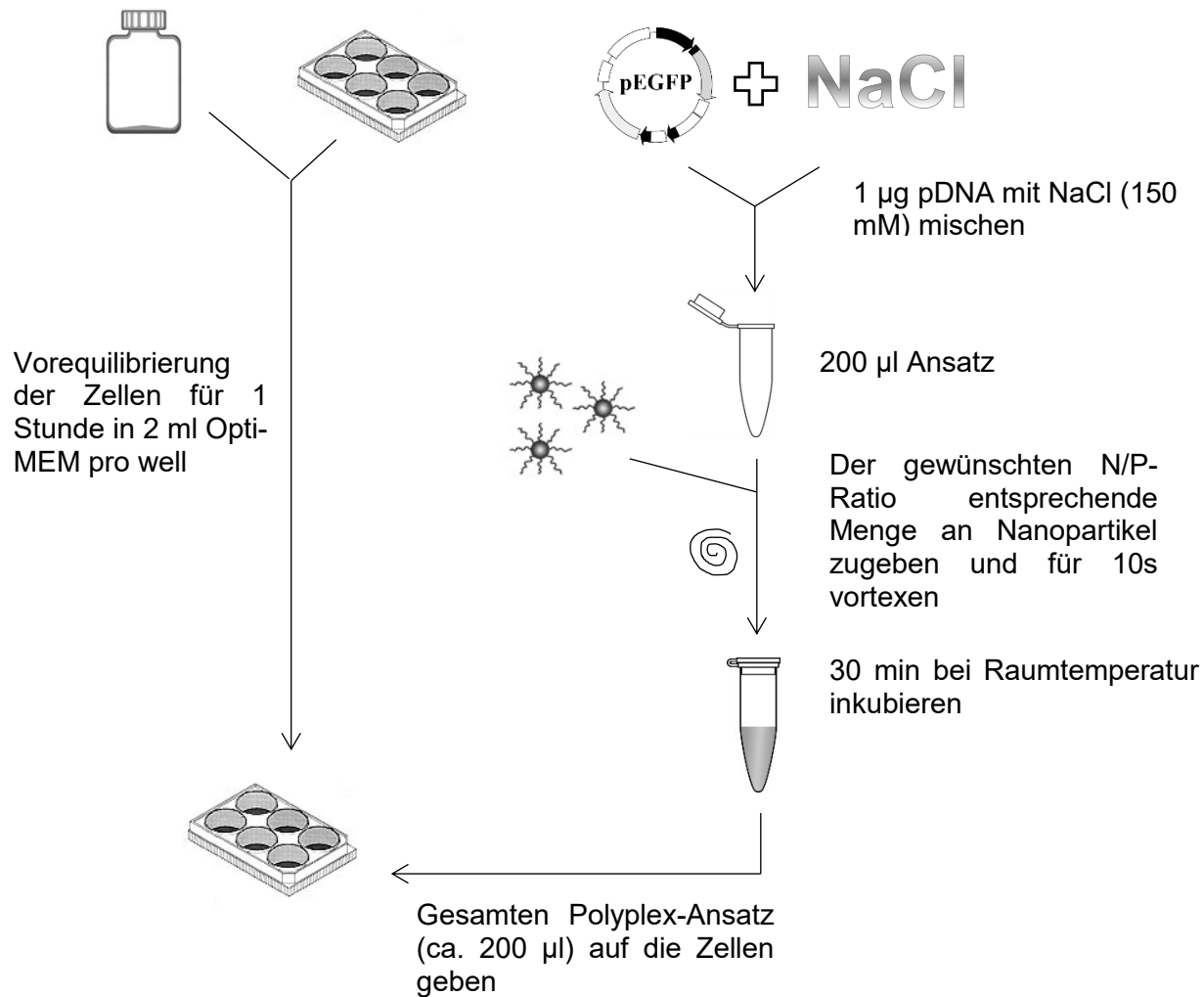


Abbildung 46: Schema zum ursprünglichen Polyplex Inkubationsprotokoll

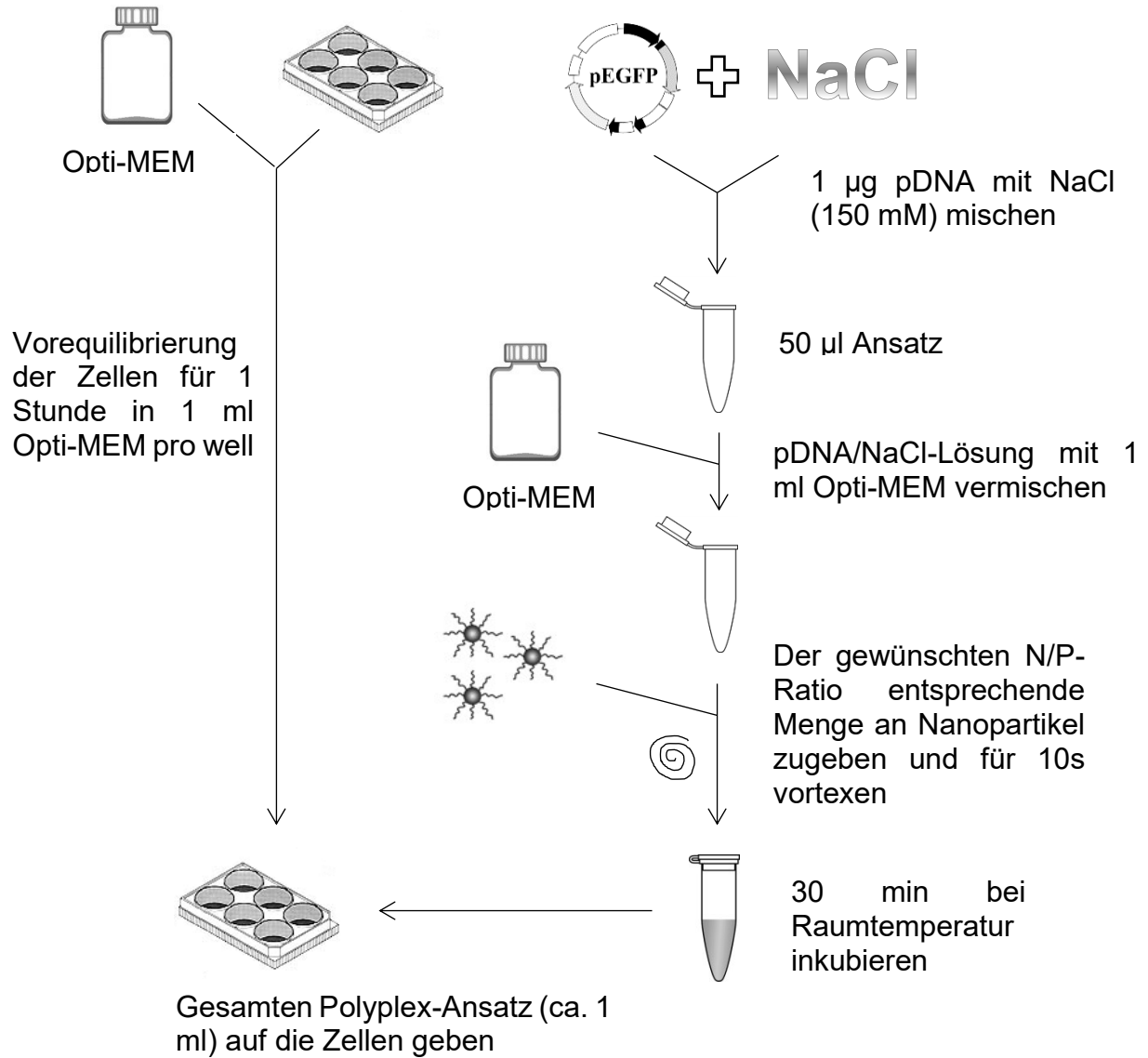


Abbildung 47: Schema zum adaptierten Polyplex Inkubationsprotokoll

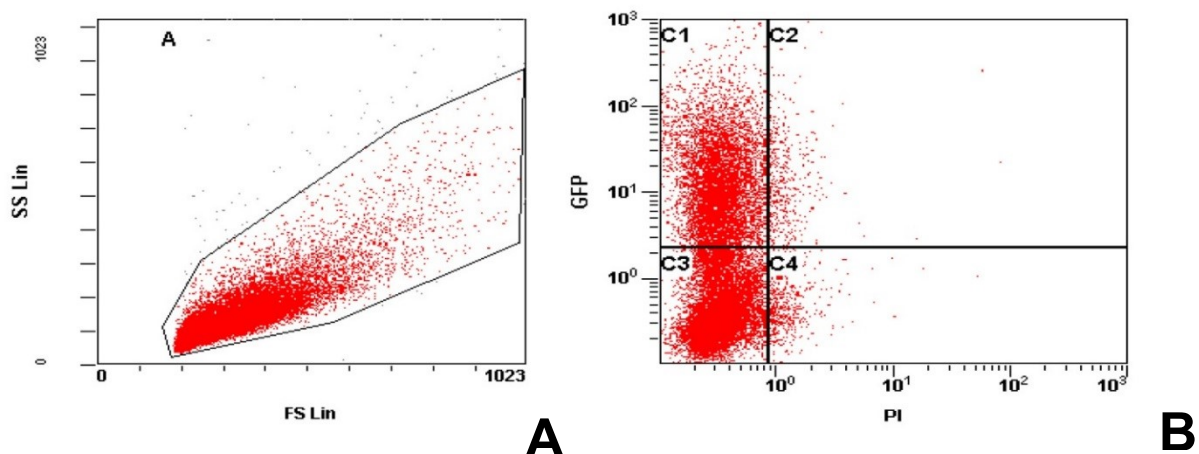


Abbildung 48: Ausgewählte Dot-Plots der Messung im Durchflusszytometer als Beispiel für die Verteilung der Zellen und der Auswahl des Gates.

Die Zellen von Gate A (A) sind in B) als Propidiumiodidsignal (PI) gegen EGFP-Signal aufgetragen. Y-Achse entspricht dem Seitwärtsstreulicht (SS, side scatter), die X-Achse dem Vorwärtsstreulicht (FS, front scatter)

8.2.4.3 Untersuchung des zellulären Magnetismus

8.2.4.3.1. Separierung mittels Magnetic Rack

Die transfizierten Zellen wurden geerntet, bei den adhären Zellen war hierzu ein vorherige Ablösung durch Zugabe von Trypsin-EDTA notwendig (siehe auch Kapitel 8.2.4.1 Stammhaltung). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 200 g), das Pellet in 1,4 ml RPMI-Medium (L929-Zellen: MEM-Medium) resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt, in das Magnetic Rack gestellt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die nicht-magnetischen Zellen sinken während der Inkubationszeit auf den Gefäßboden hinab, während die magnetischen Zellen an der Gefäßwand zurückgehalten werden. Am nächsten Tag wurde der Überstand mitsamt sedimentierter Zellen per Pipette abgetrennt, der Gefäßboden zweimal mit 15 µl DPBS gespült, um verbleibende nicht-magnetische Zellen zu resuspendieren und die Aliquots in einem separaten Gefäß gesammelt und kurz gevortexed (= nicht-magnetische Zellfraktion). Im Anschluss wurde das Eppendorf Gefäß aus dem „Magnetic Rack“ entfernt, 1,4 ml DPBS zugegeben und gevortexed um die Zellen an der Gefäßwand zu resuspendieren (= magnetische Zellfraktion). Schließlich wurde die Zellzahl beider Zellfraktionen im Vi-Cell bestimmt.

8.2.4.3.2. Magnetische Abtrennung mittels MACS

Die magnetische Abtrennung mit dem MACS-System (Magnetic Activated Cell Sorting)¹⁸¹ erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

8.2.4.4 Zytotoxizitätsstudien

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Silica@PDMAEMA}$ Nanopartikel wurde der nach ISO 10993-5 genormte MTT-Test verwendet.²²⁶

Am Tag vor der Durchführung des Tests wurden die L929-Zellen (CCL-1, ATCC) in 96-well Platen bei einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen in 100 μl MEM Kulturmedium (MEM, 10 % v/v FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin) pro well ausplattiert. Der äußere Rand der Platte wurde ausgespart, aber bei der darauf folgenden Durchführung mit behandelt und diente so zugleich als Leerwert (= 60 wells mit Zellen). Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit. Nach 24 h wurde das Kulturmedium entfernt und das zu testende Polymer (in MEM-Medium) zugegeben. Jede Verdünnung wurde in sechsfacher Ausführung getestet, die Negativkontrolle entsprach MEM-Kulturmedium ohne Polymer (= 100% Vitalität). Nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit) wurde das Medium abgesaugt, durch 50 μl MTT-Lösung (1 mg/ml) ersetzt und weitere 2h inkubiert. Anschließend wurde die MTT-Lösung durch Umdrehen und Abklopfen der Platte entfernt, 100 μl Isopropanol zugegeben und die Platte sanft geschwenkt, um das Formazan zu lösen. Die Messung der Absorption erfolgte in einem „microplate reader“ (Genios Pro, Tecan) bei einer Wellenlänge von 580 nm. Für die Bestimmung der mittleren letalen Dosis (LD_{50}) der Testsubstanz wurde in SigmaPlot (V12.3, Systat Software, Inc) eine nichtlineare logistische Regression mit 4 Parametern verwendet (siehe Gleichung 1). Auf der Y-Ache (linear) wurde die Vitalität, auf der X-Ache (dekadisch-logarithmisch) die Konzentration der Testsubstanz aufgetragen.

$$F(x) = \frac{(A-D)}{1+(\frac{x}{C})^B} + D \quad (1)$$

Dabei bedeuten:

- A: Minimum Asymptote
- B: „Hill slope“ (Kurvensteigung)
- C: Wendepunkt
- D: Maximum Asymptote

Als statistischer Test für die Signifikanz der Regression wurde der Shapiro-Wilk-Test²²⁷ angewandt. Ist der P-Wert größer als 0,05 liegt eine Normalverteilung vor (notwendig für eine sigmoidale Regressionskurve).

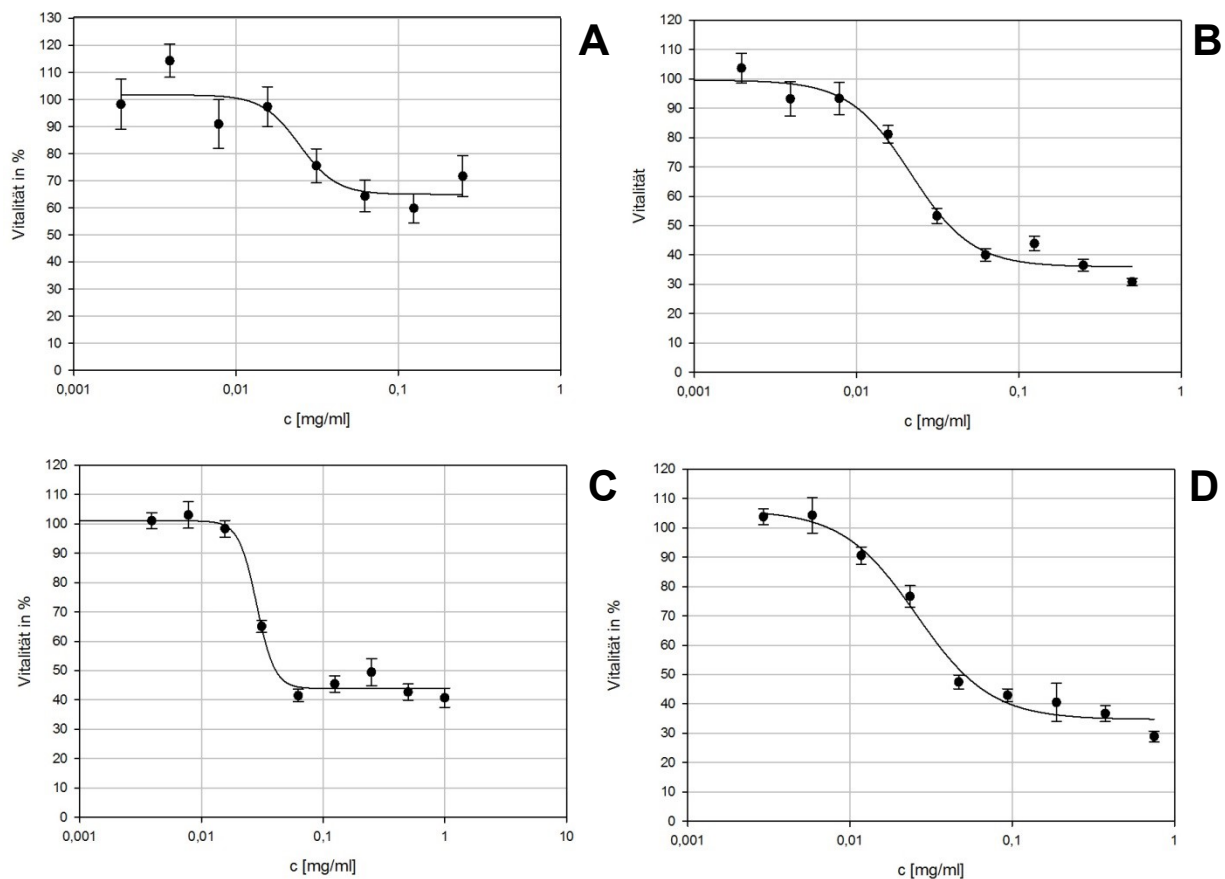


Abbildung 49: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in L929-Zellen getesteten Nanopartikels NS4 (γ -Fe₂O₃@Silica@(PDMAEMA₅₄₀)₉₁).

Aufgetragen sind die Werte der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration c. Die Kurve wurde durch nichtlineare logistische Regression mit 4 Parametern ermittelt. Als statistischer Signifikanztest wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet, dabei wurden folgende p-Werte erhalten: P = 0,9259 (A); P = 0,7331 (B); P = 0,0332 (C); P = 0,3363 (D). Die Messungen wurden während der Masterarbeit angefertigt und sind zur besseren Vergleichbarkeit an dieser Stelle aufgeführt.

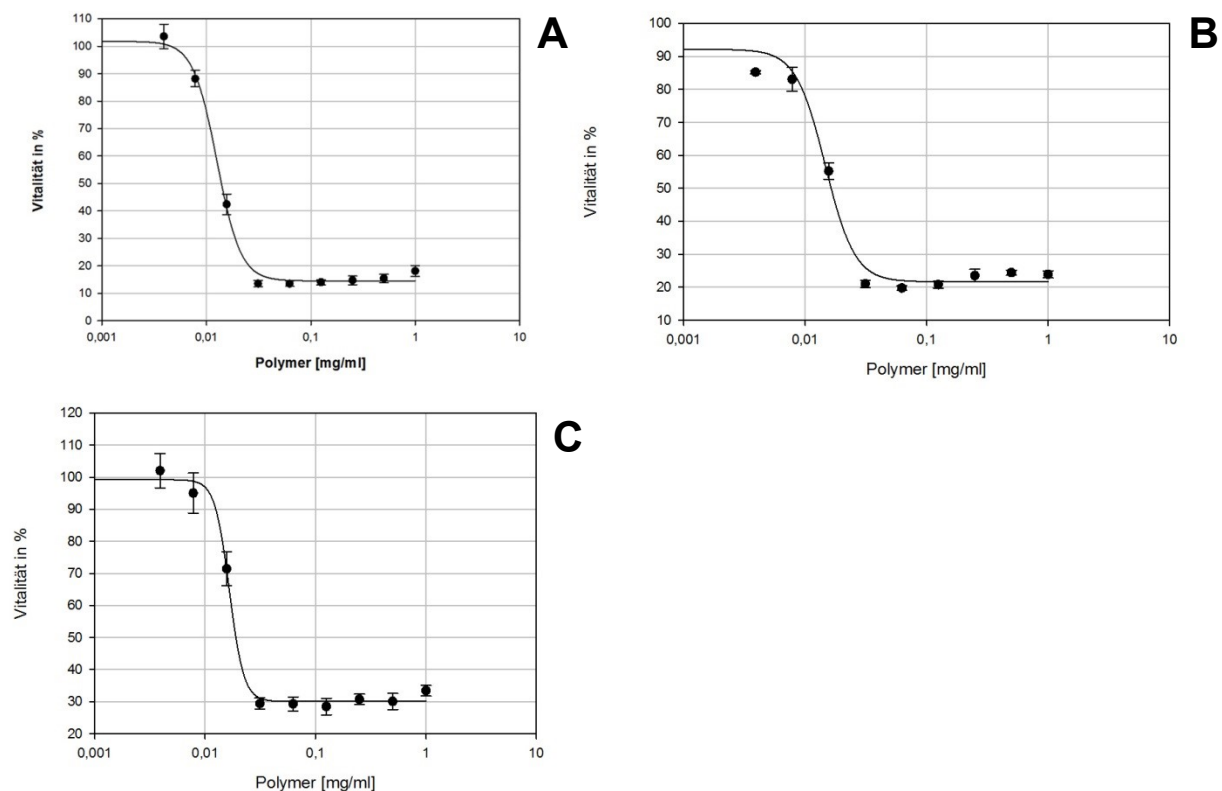


Abbildung 50: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in L929-Zellen getesteten Polymers L-PEI (25 kDa).

Aufgetragen sind die Werte der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration c . Die Kurve wurde durch nichtlineare logistische Regression mit 4 Parametern ermittelt. Als statistischer Signifikanztest wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet, dabei wurden folgende p-Werte erhalten: $P = 0,9579$ (A); $P = 0,7411$ (B); $P = 0,8824$ (C). Die Messungen wurden während der Masterarbeit angefertigt und sind zur besseren Vergleichbarkeit an dieser Stelle aufgeführt.

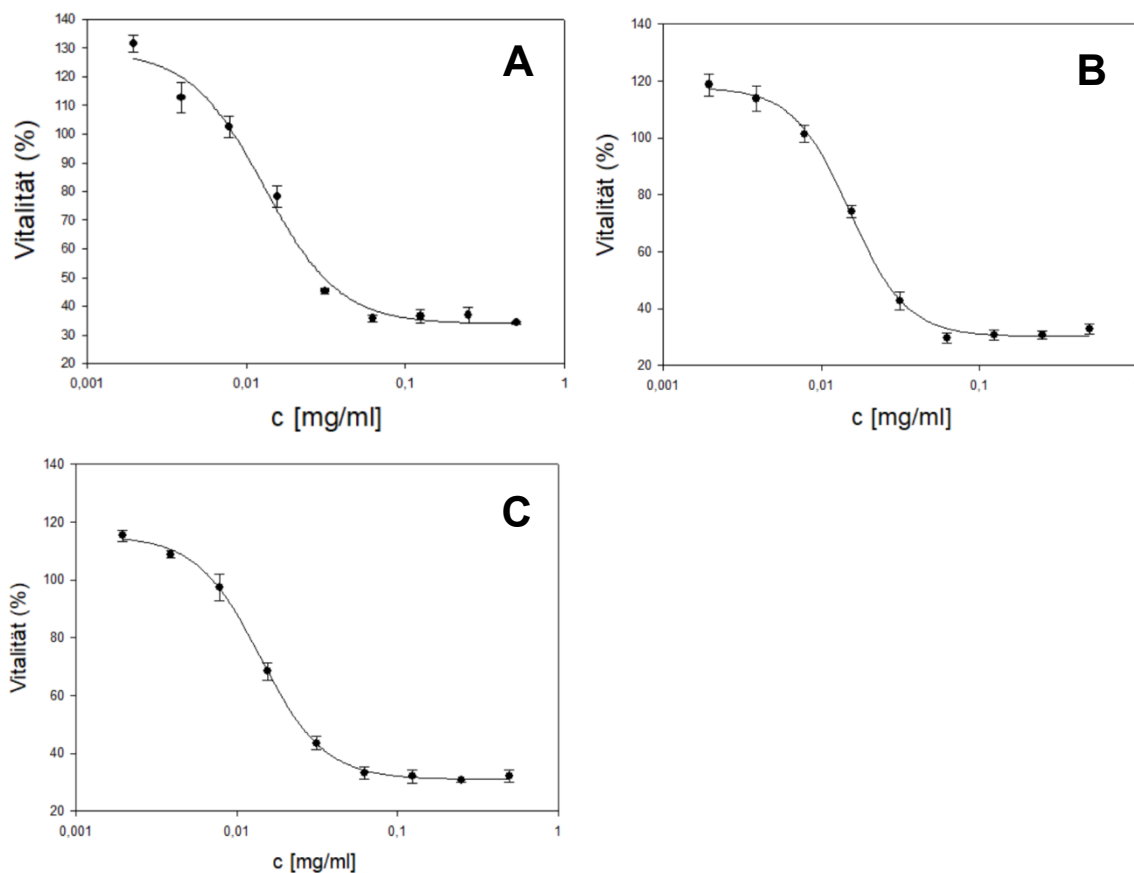


Abbildung 51: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in CHO-Zellen getesteten Polymers L-PEI (25 kDa).

Aufgetragen sind die Werte der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration c . Die Kurve wurde durch nichtlineare logistische Regression mit 4 Parametern ermittelt. Als statistischer Signifikanztest wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet, dabei wurden folgende p-Werte erhalten: $P = 0,7913$ (A); $P = 0,9388$ (B); $P = 0,7382$ (C)

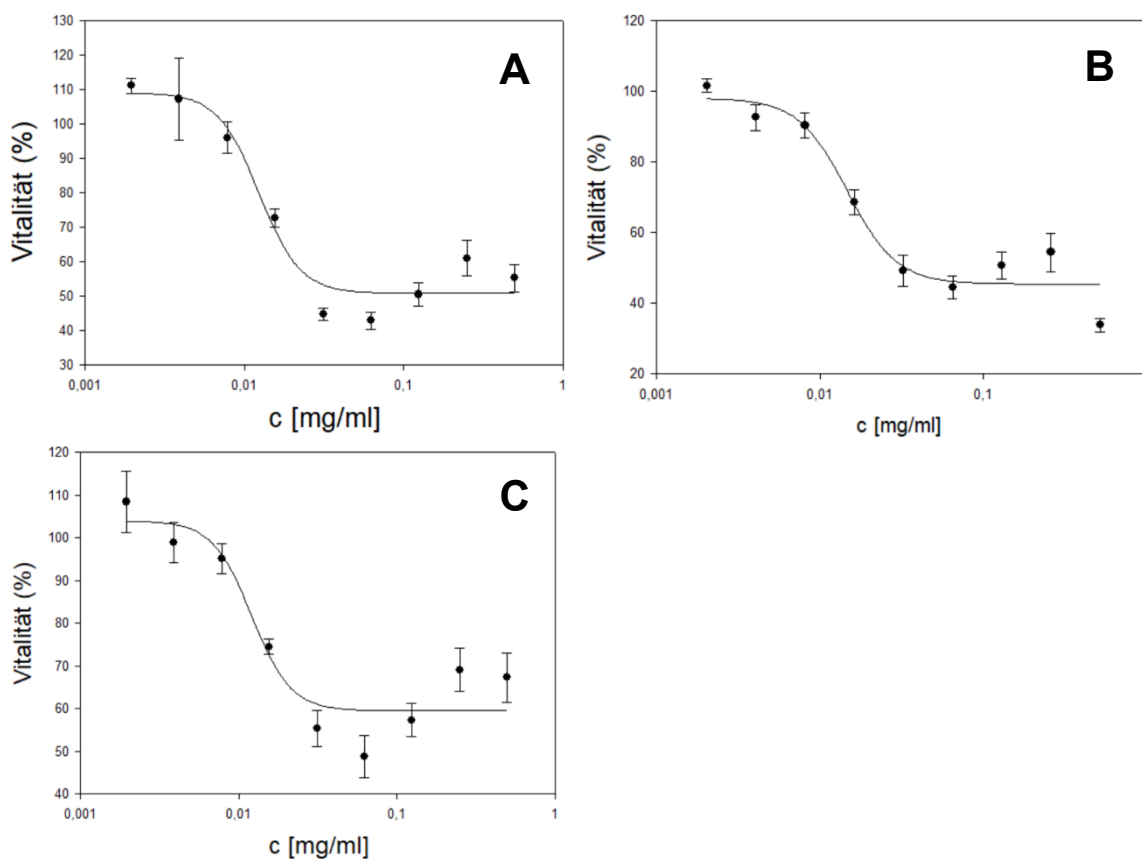


Abbildung 52: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in L929-Zellen getesteten Nanopartikels NS4 (γ - Fe_2O_3 @Silica@(PDMAEMA₅₄₀)₉₁).

Aufgetragen sind die Werte der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration c . Die Kurve wurde durch nichtlineare logistische Regression mit 4 Parametern ermittelt. Als statistischer Signifikanztest wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet, dabei wurden folgende p-Werte erhalten: $P = 0,7599$ (A); $P = 0,8460$ (B); $P = 0,9623$ (C).

8.2.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

8.2.5.1 Präparation der Säugerzellen für die Elektronenmikroskopie

Das Vorgehen für die chemische Fixierung und Präparation der Zellen für die Elektronenmikroskopie wurde von dem Protokoll von Rogowski et al. (2013)²¹³ adaptiert.

8.2.5.1.1. Chemische Fixierung und Vorkontrastierung

Die durch Trypsinierung geernteten CHO-Zellen wurden bei 1050 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit 25%igem Glutaraldehyd versetztes Kulturmedium (Finale Konzentration: 2,5%) überschichtet. Nach 30 min Inkubationszeit wurde das Medium durch Fixierungspuffer (siehe Kapitel 8.2.1.4) ausgetauscht. Die Fixierung erfolgte für 4 h bei 4 °C, wobei alle 30 min der Fixierungspuffer durch frischen ersetzt wurde. Anschließend wurden die Zellpellets 3-mal für je 20 min mit Waschpuffer (siehe Kapitel 8.2.1.4), und 3-mal für je 20 min mit VE-H₂O gewaschen. Als nächstes wurden die Zellpellets in 1% OsO₄ (verdünnt mit VE-H₂O) für 120 min bei 4 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellpellets 4-mal für je 10 min mit VE-H₂O gewaschen. Für die Negativkontrastierung der Proben wurden die Zellpellets in 2 % Uranylacetat (verdünnt mit VE-H₂O) für 90 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 3-mal für je 20 min mit VE-H₂O gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellpellets in handwarmer Agarose (2% w/v in VE-H₂O) eingeschlossen. Bei einem Durchmesser von > ~ 2-3 mm wurden die Pellets zuvor vorsichtig mit einer Rasierklinge zerteilt.

8.2.5.1.2. Entwässerung und Einbettung in Epon

Vor der Einbettung in Epoxidharz (Epon) muss eine Entwässerung der Proben erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die Proben in einer Serie von aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (vortemperiert) nach folgenden Schema inkubiert:

- 30 % Ethanol, 15 min bei 4 °C
- 50 % Ethanol, 15 min bei 4 °C
- 70 % Ethanol, 15 min bei -20 °C
- 95 % Ethanol, 15 min bei -20 °C

- 3 x 100 % Ethanol, je 20 min bei -20 °C
- 100% Ethanol / Propylenoxid 1 : 1, 15 min bei -20 °C
- 2 x Propylenoxid, je 15 min bei -20 °C

Im Anschluss erfolgte die Infiltrierung der Proben mit Epon nach folgendem Schema:

- Propylenoxid / Epon 3 : 1, 3 – 4 h bei -20 °C
- Propylenoxid / Epon 1 : 1, 3 – 4 h bzw. über Nacht bei -20 °C
- Propylenoxid / Epon 1 : 3, 3 – 4 h bei Raumtemperatur
- 3 x Epon pur, je 3 – 4 h bei Raumtemperatur

Am nächsten Tag wurden die Proben auf kleine Epon-Blöcke aufgebracht und im Trockenofen für 1 – 2 Tage bei 60 °C das Epon auspolymerisiert.

8.2.5.2 Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM Aufnahmen wurde mit einem Zeiss/LEO EM922 OMEGA EFTEM Elektronenmikroskop durchgeführt, welches mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrieben wurde. Die Aufnahmen wurden digital mit einem CCD Kamerasystem aufgenommen, indem eine unten angebrachte CCD Kamera (Ultrascan 1000, Gatan) mit einem digitalen Bildverarbeitungssystem kombiniert wurde (Gatan Digital Micrograph).

8.2.5.3 Durchführung der Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Für die Cryo-TEM Untersuchungen wurde ein 2 µL Dispersions-Tröpfchen auf ein Lacey-Kohlefilm beschichtetes Kupfernetzchen gegeben und der Großteil der Flüssigkeit mit einem Fließpapier abgezogen, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm übrig blieb, der mit Hilfe eines Leica EM GP Plunge Freezer auf dem Netzchen ausgebreitet wurde. Die Proben wurden augenblicklich vitrifiziert durch Immersion in flüssigem

Ethan und heruntergekühlt auf ungefähr -175°C durch Verwendung einer Temperaturkontrollierten Gefriereinheit (Leica EM GP, Deutschland). Die Temperatur und die Feuchtigkeit wurden überwacht und während allen Präparationsschritten in der Klimakammer konstant gehalten. Nach dem Einfrieren wurden die Proben in einen Cryo-Transfer Halter gegeben (CT3500, Gatan, Deutschland) und in ein Zeiss/LEO EM922 OMEGA EFTEM (Carl Zeiss Microscopy, Germany) transferiert. Die Untersuchungen wurden bei Temperaturen von ungefähr -178 °C durchgeführt. Nullverlust-gefilterte Mikrographen ($E \sim 0$ eV) wurden unter reduzierten Dosisbedingungen aufgenommen (100 – 1000 e/nm²).

Um den Durchmesser der Eisenoxid-Kerne zu bestimmen, wurden die Aufnahmen mit ImageJ²¹² per FFT-Bandpass Filter und der „adjust threshold“ Funktion (A2, B2) aufbereitet. Auf den nun binären Bilddateien wurden kreisrunde Partikel über die „Analyze Particles“ Funktion identifiziert. Über die Kreisfläche A wurden schließlich per Formel 1 die Durchmesser berechnet:

$$1) \quad d = 2 \cdot \sqrt{(A/\pi)}$$

Dabei bedeuten:

d = Durchmesser

A = Kreisfläche

8.3 Statistische Auswertungen

Für die statistische Analysen wurde die Software R Version 3.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) mit den Paketen Hmisc Version 3.17-4, Corplot Version 0.77, and RColorBrewer Version 1.1.2 verwendet.²²⁸ Der Korrelationskoeffizient rho wurde gemäß dem Nichtparametrischen Spearman Korrelationsstatistiktest berechnet und dazu verwendet, um Korrelationen zwischen den Datensätzen zu berechnen. Rho Werte zwischen 0 und 0,25 wurde als keine Korrelation, 0,25 bis 0,5 als schwache, 0,5 bis 0,75 als mittelstarke und 0,75 bis 1 als starke Korrelation definiert. Die Rho Werte wurden graphisch als Korrelogramm dargestellt. Datenpunkte mit $p > 0,01$ wurden als statistisch nicht signifikant betrachtet und daher von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen.

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Ablaufs einer Transfektion	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der verwendeten Nanosterne und kationischen Polymere	10
Abbildung 3: Schema des Ablaufs der Transfektion nach dem adaptierten Transfektionsprotokoll.....	12
Abbildung 4: Bestimmung des Zetapotentials von Polyplexen in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis.....	20
Abbildung 5: Größenbestimmung von Polyplexen der Nanosterne NS1 – NS4	22
Abbildung 6: Größenmessung von Polyplexen der Nanosterne NS5 – NS8	23
Abbildung 7: Größenmessung von Polyplexen der Nanosterne NS9 - NS12	24
Abbildung 8: Kinetik der hydrodynamischen Radien (R_h) in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis und der Inkubationsdauer	29
Abbildung 9: Kinetik der hydrodynamischen Radien (R_h) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und –dauer	31
Abbildung 10: DNA-Schmelztemperatur als Funktion des N/P-Verhältnis	33
Abbildung 11: pH der Polyplex-Lösung in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis	34
Abbildung 12: Umsetzung von MTT zu Formazan.....	39
Abbildung 13: Größenmessung der Polyplexe abhängig vom N/P-Verhältnis und dem verwendeten Protokoll	41
Abbildung 14: Transfektion von L929- & CHO Zellen bei verschiedenen N/P-Verhältnissen.....	44
Abbildung 15: Einfluss des N/P-Verhältnisses auf die Transfektion	47
Abbildung 16: Magnetic rack zur Analyse der magnetischen Zellfraktion	51
Abbildung 17: Transfektionseffizienzen (■), magnetische Zellfraktionen (■) und Viabilitäten (—○—) 26 h nach der Transfektion	53
Abbildung 18: Einfluss der Kontaktzeit zwischen Zellen und Polyplexen/Nanosternen auf die Transgenexpression und die magnetischen Zellfraktionen	57
Abbildung 19: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Transfektionseffizienz und den Magnetismus	59
Abbildung 20: Transfektionseffizienz und Magnetismus in verschiedenen Zelllinien	62
Abbildung 21: Multistand Apparatur (1) mit MidiMACS Separator (2) und LS Column (3).	65

Abbildung 22: Magnetische Testabtrennung per MACS von nicht-transfizierten Zellen	66
Abbildung 23: EGFP Expression und Anteil magnetischer Zellen nach Zellseparierung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.....	67
Abbildung 24: EGFP Expression sowie Anteil magnetischer Zellen bei erneuter magnetischer Abtrennung nach Rekultivierung	69
Abbildung 25: Korrelogramm zwischen den Nanostern/Polyplex Charakteristika und den zellulären Antworten (Viabilität, Transfektionseffizienz, Magnetismus)	72
Abbildung 26: Größenmessung mittels DLS von Polyplexen des Nanosterne DB2 .	76
Abbildung 27: Bestimmung des Zetapotentials von DB2 Polyplexen in Abhängigkeit von der N/P-Ratio	77
Abbildung 28: Transfektionseffizienzen (■), magnetische Zellfraktionen (■) und Viabilitäten (—○—).....	78
Abbildung 29: Transfektionseffizienz (■) und Viabilität (—○—) von DB2 in der Anwesenheit von fötalem Kälberserum	80
Abbildung 30: Einfluss von Serum auf die Transfektionseffizienzen.....	81
Abbildung 31: Cryo-TEM Aufnahmen der Nanosterne NS4 und NS5.....	85
Abbildung 32: Analyse von zentrifugierten CHO-K1 Zellen im Durchflusszytometer	87
Abbildung 33: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS2 Nanosternen	89
Abbildung 34: TEM Aufnahmen von NS2 Nanopartikel-Clustern in CHO Zellen	90
Abbildung 35: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS1 Nanosternen	91
Abbildung 36: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS5 Nanosternen	92
Abbildung 37: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS6 Nanosternen	93
Abbildung 38: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS6 Nanosternen	97
Abbildung 39: TEM Aufnahmen von CHO-Zellen mit NS12 Nanosternen	99
Abbildung 40: TEM Aufnahmen von NS12 Polyplexen mit CHO-Zellen	100
Abbildung 41: Elektronenenergieverlustspektroskopie-Analyse der intrazellulären Eisenverteilung	102
Abbildung 42: Transfektion von L929 Zellen, abhängig von der N/P-Ratio und dem verwendeten Protokoll	108
Abbildung 43: Restriktionskarte und Multiple Cloning Site (MCS) des pEGFP-N1 Vektors	112
Abbildung 44: Restriktionskarte und Multiple Cloning Site (MCS) des pZsYellow1-N1 Vektors	113

Abbildung 45: Restriktionskarte und Multiple Cloning Site (MCS) vom pmCherry-N1 Vektor	113
Abbildung 46: Schema zum ursprünglichen Polyplex Inkubationsprotokoll	119
Abbildung 47: Schema zum adaptierten Polyplex Inkubationsprotokoll.....	120
Abbildung 48: Ausgewählte Dot-Plots der Messung im Durchflusszytometer als Beispiel für die Verteilung der Zellen und der Auswahl des Gates.	121
Abbildung 49: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in L929-Zellen getesteten Nanopartikels NS4 (γ -Fe ₂ O ₃ @Silica@(PDMAEMA ₅₄₀) ₉₁). ..	123
Abbildung 50: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in L929-Zellen getesteten Polymers L-PEI (25 kDa).	124
Abbildung 51: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in CHO-Zellen getesteten Polymers L-PEI (25 kDa).	125
Abbildung 52: Regressionskurven des im Rahmen des MTT-Zytotoxizitätstests in L929-Zellen getesteten Nanopartikels NS4 (γ -Fe ₂ O ₃ @Silica@(PDMAEMA ₅₄₀) ₉₁). ..	126

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufbau und Zusammensetzung der Nanosterne.....	11
Tabelle 2: Variation der Zusammensetzung der Polyplex-Ansätze	28
Tabelle 3: Zytotoxizität der Nanosterne NS4 und von L-PEI.....	43
Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz/Viabilität und N/P-Verhältnis sowie zugegebene Menge an pDNA und Polymer.	49
Tabelle 5: Molekulare Charakteristiken der PDMAEMA-PDEGMA Nanosterne	75
Tabelle 6: Größe der Nanosterne in verschiedenen Lösungsmitteln	107

8.6 Literaturverzeichnis

1. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173–3178 (2010).
2. Feng, M., Lee, D. & Li, P. Intracellular uptake and release of poly(ethyleneimine)-co-poly(methyl methacrylate) nanoparticle/pDNA complexes for gene delivery. *Int. J. Pharm.* **311**, 209–214 (2006).

3. Huang, N.-C., Ji, Q., Ariga, K. & Hsu, S. Nanosheet transfection: effective transfer of naked DNA on silica glass. *NPG Asia Mater.* **7**, e184 (2015).
4. Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. & McCabe, D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 9568–9572 (1990).
5. Dinçer, S., Türk, M. & Pişkin, E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther.* **12**, S139–S145 (2005).
6. Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 581–593 (2005).
7. Edelstein, M. L., Abedi, M. R. & Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007–an update. *J. Gene Med.* **9**, 833–842 (2007).
8. Verma, I. M. & Somia, N. Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239–242 (1997).
9. Yue, Y. & Wu, C. Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. *Biomater. Sci.* (2012). doi:10.1039/C2BM00030J
10. Fu, H., Hu, Y., McNelis, T. & Hollinger, J. O. A calcium phosphate-based gene delivery system. *J. Biomed. Mater. Res. A* **74A**, 40–48 (2005).
11. Guo, X. & Huang, L. Recent Advances in Non-viral Vectors for Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.* **45**, 971–979 (2012).
12. Boussif, O. *et al.* A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7297–7301 (1995).
13. Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S. & Greiner, A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater. Today* **15**, 388–393 (2012).
14. Dubruel, P. & Schacht, E. Vinyl Polymers as Non-Viral Gene Delivery Carriers: Current Status and Prospects. *Macromol. Biosci.* **6**, 789–810 (2006).

15. Newland, B. *et al.* A highly effective gene delivery vector – hyperbranched poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) from in situ deactivation enhanced ATRP. *Chem. Commun.* **46**, 4698 (2010).
16. Schallon, A. *et al.* Performance of three PDMAEMA-based polycation architectures as gene delivery agents in comparison to linear and branched PEI. *React. Funct. Polym.* **70**, 1–10 (2010).
17. Synatschke, C. V., Schallon, A., Jérôme, V., Freitag, R. & Müller, A. H. E. Influence of polymer architecture and molecular weight of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) polycations on transfection efficiency and cell viability in gene delivery. *Biomacromolecules* **12**, 4247–4255 (2011).
18. Rodriguez, A., del, A. & Angeles, M. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. in *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* (ed. Martin, F.) (InTech, 2013).
19. Sun, C., Tang, T., Uludağ, H. & Cuervo, J. E. Molecular dynamics simulations of DNA/PEI complexes: effect of PEI branching and protonation state. *Biophys. J.* **100**, 2754–2763 (2011).
20. Dunlap, D. D., Maggi, A., Soria, M. R. & Monaco, L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3095–3101 (1997).
21. Aied, A. *et al.* A fluorescently labeled, hyperbranched polymer synthesized from DE-ATRP for the detection of DNA hybridization. *Polym. Chem.* **3**, 332–334 (2012).
22. Wolf, H. K. de *et al.* Biodegradable Poly(2-Dimethylamino Ethylamino)Phosphazene for In Vivo Gene Delivery to Tumor Cells. Effect of Polymer Molecular Weight. *Pharm. Res.* **24**, 1572–1580 (2007).
23. Sang, Y. *et al.* Salt ions and related parameters affect PEI–DNA particle size and transfection efficiency in Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology* **67**, 67–74 (2015).

24. Lundqvist, M. *et al.* Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 14265–14270 (2008).
25. Kunath, K. *et al.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Controlled Release* **89**, 113–125 (2003).
26. Cai, J. *et al.* Effect of Chain Length on Cytotoxicity and Endocytosis of Cationic Polymers. *Macromolecules* **44**, 2050–2057 (2011).
27. Elouahabi, A. & Ruyschaert, J.-M. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol. Ther.* **11**, 336–347 (2005).
28. van der Aa, M. A. E. M. *et al.* Cellular Uptake of Cationic Polymer-DNA Complexes Via Caveolae Plays a Pivotal Role in Gene Transfection in COS-7 Cells. *Pharm. Res.* **24**, 1590–1598 (2007).
29. Ilina, P. *et al.* Genetic blockage of endocytic pathways reveals differences in the intracellular processing of non-viral gene delivery systems. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **163**, 385–395 (2012).
30. Dale, D. C., Boxer, L. & Liles, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935–945 (2008).
31. Hsu, S., Ho, T.-T. & Tseng, T.-C. Nanoparticle uptake and gene transfer efficiency for MSCs on chitosan and chitosan-hyaluronan substrates. *Biomaterials* **33**, 3639–3650 (2012).
32. Kirchhausen, T., Owen, D. & Harrison, S. C. Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016725 (2014).
33. Bitsikas, V., Jr, I. R. C. & Nichols, B. J. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *eLife* **3**, e03970 (2014).

34. Merrifield, C. J. & Kaksonen, M. Endocytic accessory factors and regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016733 (2014).
35. Parton, R. G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 185 (2007).
36. Billiet, L. *et al.* Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* **33**, 2980–2990 (2012).
37. Erbacher, P., Remy, J.-S. & Behr, J.-P. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* **6**, 138–145 (1999).
38. Jones, C. H., Chen, C.-K., Ravikrishnan, A., Rane, S. & Pfeifer, B. A. Overcoming Nonviral Gene Delivery Barriers: Perspective and Future. *Mol. Pharm.* **10**, 4082–4098 (2013).
39. Kim, T., Rothmund, T., Kissel, T. & Kim, S. W. Bio reducible polymers with cell penetrating and endosome buffering functionality for gene delivery systems. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **152**, 110–119 (2011).
40. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M. & Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* **7**, 657–663 (2005).
41. Lin, C. & Engbersen, J. F. J. Effect of chemical functionalities in poly(amido amine)s for non-viral gene transfection. *J. Controlled Release* **132**, 267–272 (2008).
42. Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr & Verkman, A. S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 44826–44831 (2003).
43. Liang, W. & W. Lam, J. K. Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. in *Molecular Regulation of Endocytosis* (ed. Ceresa, B.) (InTech, 2012).

44. Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 268–275 (1999).
45. Funhoff, A. M. *et al.* Endosomal Escape of Polymeric Gene Delivery Complexes Is Not Always Enhanced by Polymers Buffering at Low pH. *Biomacromolecules* **5**, 32–39 (2004).
46. Benjaminsen, R. V., Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M. & Andresen, T. L. The Possible “Proton Sponge ” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Mol. Ther.* **21**, 149–157 (2013).
47. Rehman, Z. ur, Hoekstra, D. & Zuhorn, I. S. Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano* **7**, 3767–3777 (2013).
48. Orrantia, E. & Chang, P. L. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Exp. Cell Res.* **190**, 170–174 (1990).
49. Schaffer, D. V., Fidelman, N. A., Dan, N. & Lauffenburger, D. A. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 598–606 (2000).
50. Strand, S. P. *et al.* Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials* **31**, 975–987 (2010).
51. Lukacs, G. L. *et al.* Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**, 1625–1629 (2000).
52. Lechardeur, D. *et al.* Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 482 (1999).
53. Wenthe, S. R. Gatekeepers of the Nucleus. *Science* **288**, 1374–1377 (2000).
54. Hu, Q. *et al.* Intracellular pathways and nuclear localization signal peptide-mediated gene transfection by cationic polymeric nanovectors. *Biomaterials* **33**, 1135–1145 (2012).

55. Schallon, A., Synatschke, C. V., Jérôme, V., Müller, A. H. E. & Freitag, R. Nanoparticulate Nonviral Agent for the Effective Delivery of pDNA and siRNA to Differentiated Cells and Primary Human T Lymphocytes. *Biomacromolecules* **13**, 3463–3474 (2012).
56. Petri-Fink, A., Chastellain, M., Juillerat-Jeanneret, L., Ferrari, A. & Hofmann, H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials* **26**, 2685–2694 (2005).
57. Vega-Villa, K. R. *et al.* Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 929–938 (2008).
58. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Publ. Online 13 Febr. 2002 Doi101038sjgt3301624* **9**, (2002).
59. Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D. & Plank, C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 2391–2411 (2007).
60. Plank, C., Zelphati, O. & Mykhaylyk, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1300–1331 (2011).
61. Freeman, M. W., Arrott, A. & Watson, J. H. L. Magnetism in Medicine. *J. Appl. Phys.* **31**, S404–S405 (1960).
62. Goodwin, S., Peterson, C., Hoh, C. & Bittner, C. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **194**, 132–139 (1999).
63. Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J. & Busquets, M. A. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8070–8101 (2015).

64. Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R. & Hadjipanayis, C. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy, and application in humans. *Int. J. Hyperthermia* **0**, 1–36 (2018).
65. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 311–330 (2005).
66. Pankhurst, Q. A., Thanh, N. T. K., Jones, S. K. & Dobson, J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. Appl. Phys.* **42**, 224001 (2009).
67. Thomsen, L. B. *et al.* Uptake and Transport of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through Human Brain Capillary Endothelial Cells. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 1352–1360 (2013).
68. Synatschke, C. V., Schallon, A., Jérôme, V., Freitag, R. & Müller, A. H. E. Influence of Polymer Architecture and Molecular Weight of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Polycations on Transfection Efficiency and Cell Viability in Gene Delivery. *Biomacromolecules* **12**, 4247–4255 (2011).
69. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **45**, 4015–4039 (2012).
70. Majewski, A. P. *et al.* Dual-Responsive Magnetic Core–Shell Nanoparticles for Nonviral Gene Delivery and Cell Separation. *Biomacromolecules* **13**, 857–866 (2012).
71. Pérez-Martínez, F. C., Carrión, B. & Ceña, V. The use of nanoparticles for gene therapy in the nervous system. *J. Alzheimers Dis. JAD* **31**, 697–710 (2012).
72. Amstad, E., Gillich, T., Bilecka, I., Textor, M. & Reimhult, E. Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups. *Nano Lett.* **9**, 4042–4048 (2009).
73. Amstad, E. *et al.* Influence of Electronegative Substituents on the Binding Affinity of Catechol-Derived Anchors to Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **115**, 683–691 (2011).

74. Achilleos, D. S. & Vamvakaki, M. End-Grafted Polymer Chains onto Inorganic Nano-Objects. *Materials* **3**, 1981–2026 (2010).
75. Mori, H., Walther, A., André, Lanzendörfer, M. G. & Müller, A. H. E. Synthesis of Highly Branched Cationic Polyelectrolytes via Self-Condensing Atom Transfer Radical Copolymerization with 2-(Diethylamino)ethyl Methacrylate. *Macromolecules* **37**, 2054–2066 (2004).
76. Heath, W. H., Senyurt, A. F., Layman, J. & Long, T. E. Charged Polymers via Controlled Radical Polymerization and their Implications for Gene Delivery. *Macromol. Chem. Phys.* **208**, 1243–1249 (2007).
77. Plamper, F. A. *et al.* Synthesis and Characterization of Star-Shaped Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) and Its Quaternized Ammonium Salts. *Macromolecules* **40**, 5689–5697 (2007).
78. Xu, F. J. & Yang, W. T. Polymer vectors via controlled/living radical polymerization for gene delivery. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 1099–1131 (2011).
79. Sahnoun, M., Charreyre, M.-T., Veron, L., Delair, T. & D’Agosto, F. Synthetic and characterization aspects of dimethylaminoethyl methacrylate reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **43**, 3551–3565 (2005).
80. Anja Schallon. Untersuchung des nicht-viralen Gentransfers mit den Polymeren PEI und PDMAEMA. (Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der Universität Bayreuth, Dissertation, 2011).
81. Stahlschmidt, U. Untersuchung von neuartigen Nanopartikeln für ihre Verwendung als Genvehikel in Tierzellen. (Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der Universität Bayreuth, 2013).

82. Zhao, Q.-Q. *et al.* N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 706–710 (2009).
83. Raup, A. *et al.* Influence of Polyplex Formation on the Performance of Star-Shaped Polycationic Transfection Agents for Mammalian Cells. *Polymers* **8**, 224 (2016).
84. Malloggi, C. *et al.* Comparative evaluation and optimization of off-the-shelf cationic polymers for gene delivery purposes. *Polym. Chem.* **6**, 6325–6339 (2015).
85. Aied, A., Greiser, U., Pandit, A. & Wang, W. Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. *Drug Discov. Today* **18**, 1090–1098 (2013).
86. Namvar, A., Bolhassani, A., Khairkhah, N. & Motevalli, F. Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection. *Biopolymers* **103**, 363–375 (2015).
87. Wadhwa, M. S., Collard, W. T., Adami, R. C., McKenzie, D. L. & Rice, K. G. Peptide-Mediated Gene Delivery: Influence of Peptide Structure on Gene Expression. *Bioconjug. Chem.* **8**, 81–88 (1997).
88. Plank, C., Tang, M. X., Wolfe, A. R. & Szoka, F. C. Branched Cationic Peptides for Gene Delivery: Role of Type and Number of Cationic Residues in Formation and in Vitro Activity of DNA Polyplexes. *Hum. Gene Ther.* **10**, 319–332 (1999).
89. van de Wetering, P., Moret, E. E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E., van Steenberghe, M. J. & Hennink, W. E. Structure–Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* **10**, 589–597 (1999).
90. Benfer, M. & Kissel, T. Cellular uptake mechanism and knockdown activity of siRNA-loaded biodegradable DEAPA-PVA-g-PLGA nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **80**, 247–256 (2012).

91. Li, H., Xiao, Y., Niu, J., Chen, X. & Ping, Q. Preparation of a cationic nanoemulsome for intratumoral drug delivery and its enhancing effect on cellular uptake in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 8547–8555 (2011).
92. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
93. Batard, P., Jordan, M. & Wurm, F. Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* **270**, 61–68 (2001).
94. Ketola, T.-M. *et al.* Role of Polyplex Intermediate Species on Gene Transfer Efficiency: Polyethylenimine–DNA Complexes and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **115**, 1895–1902 (2011).
95. Stepanenko, O. V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N. & Turoverov, K. K. Fluorescent Proteins as Biomarkers and Biosensors: Throwing Color Lights on Molecular and Cellular Processes. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 338–369 (2008).
96. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **90**, 1103–1163 (2010).
97. Elouahabi, A. & Ruyschaert, J.-M. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol. Ther.* **11**, 336–347 (2005).
98. Won, Y.-Y., Sharma, R. & Konieczny, S. F. Missing pieces in understanding the intracellular trafficking of polycation/DNA complexes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **139**, 88–93 (2009).
99. van Gaal, E. V. B., Spierenburg, G., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A. & Mastrobattista, E. Flow cytometry for rapid size determination and sorting of nucleic acid containing nanoparticles in biological fluids. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **141**, 328–338 (2010).

100. van Gaal, E. V. B. *et al.* How to screen non-viral gene delivery systems in vitro? *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **154**, 218–232 (2011).
101. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. & Low, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 381 (2013).
102. ISO 22412:2017 - Particle size analysis -- Dynamic light scattering (DLS). Available at: <https://www.iso.org/standard/65410.html>. (Accessed: 3rd January 2018)
103. Sachs, J. N., Shen, H. & Saltzman, W. M. Polymers for cancer gene therapy: Browsing the library. *Gene Therapy* (2005). doi:10.1038/sj.gt.3302500
104. Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N. & Elenitoba-Johnson, K. S. J. Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods* **25**, 430–442 (2001).
105. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* **32**, e103 (2004).
106. Schallon, A. *et al.* DNA Melting Temperature Assay for Assessing the Stability of DNA Polyplexes Intended for Nonviral Gene Delivery. *Langmuir* **27**, 12042–12051 (2011).
107. Xu, F.-J. *et al.* Pentablock copolymers of poly(ethylene glycol), poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery. *Biomaterials* **29**, 3023–3033 (2008).
108. Guo, S. *et al.* Amphiphilic and biodegradable methoxy polyethylene glycol-block-(polycaprolactone-graft-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)) as an effective gene carrier. *Biomaterials* **32**, 879–889 (2011).
109. MacLaughlin, F. C. *et al.* Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J. Controlled Release* **56**, 259–272 (1998).

110. Gary, D. J., Min, J., Kim, Y., Park, K. & Won, Y.-Y. The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-Based siRNA Complexes. *Macromol. Biosci.* **13**, 1059–1071 (2013).
111. Picola, I. P. D. *et al.* Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan–DNA nanoparticles. *J. Exp. Nanosci.* **8**, 703–716 (2013).
112. van de Wetering, P., Cherng, J.-Y., Talsma, H. & Hennink, W. E. Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)/plasmid complexes. *J. Controlled Release* **49**, 59–69 (1997).
113. Lartigue, L. *et al.* Nanomagnetic Sensing of Blood Plasma Protein Interactions with Iron Oxide Nanoparticles: Impact on Macrophage Uptake. *ACS Nano* **6**, 2665–2678 (2012).
114. Fayol, D., Luciani, N., Lartigue, L., Gazeau, F. & Wilhelm, C. Managing Magnetic Nanoparticle Aggregation and Cellular Uptake: a Precondition for Efficient Stem-Cell Differentiation and MRI Tracking. *Adv. Healthc. Mater.* **2**, 313–325 (2013).
115. Romøren, K., Thu, B. J., Bols, N. C. & Evensen, Ø. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1663**, 127–134 (2004).
116. Cherng, J.-Y., Talsma, H., Verrijck, R., Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. The effect of formulation parameters on the size of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **47**, 215–224 (1999).
117. Cm, W. Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood* **97**, 2221–2229 (2001).
118. He, E. *et al.* Polyplex formation between four-arm poly(ethylene oxide)-b-poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate) and plasmid DNA in gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **91A**, 708–718 (2009).

119. Mendrek, B. *et al.* Nonviral Plasmid DNA Carriers Based on N,N'-Dimethylaminoethyl Methacrylate and Di(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate Star Copolymers. *Biomacromolecules* **16**, 3275–3285 (2015).
120. Dubruel, P. *et al.* Physicochemical and biological evaluation of cationic polymethacrylates as vectors for gene delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 211–220 (2003).
121. Rungsardthong, U. *et al.* Effect of Polymer Ionization on the Interaction with DNA in Nonviral Gene Delivery Systems. *Biomacromolecules* **4**, 683–690 (2003).
122. Liu, W. *et al.* An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials* **26**, 2705–2711 (2005).
123. Sigolaeva, L. V. *et al.* Sequential pH-dependent adsorption of ionic amphiphilic diblock copolymer micelles and choline oxidase onto conductive substrates: toward the design of biosensors. *Macromol. Biosci.* **14**, 1039–1051 (2014).
124. Přádný, M. & Ševčík, S. Precursors of hydrophilic polymers, 7. Potentiometric properties and structure of copolymers of 2-dimethylaminoethyl methacrylate. *Makromol. Chem.* **188**, 227–238 (1987).
125. Stahlschmidt, U., Jérôme, V., Majewski, A. P., Müller, A. H. E. & Freitag, R. Systematic Study of a Library of PDMAEMA-Based, Superparamagnetic Nano-Stars for the Transfection of CHO-K1 Cells. *Polymers* **9**, 156 (2017).
126. Raup, A., Jérôme, V., Freitag, R., Synatschke, C. V. & Müller, A. H. E. Promoter, transgene, and cell line effects in the transfection of mammalian cells using PDMAEMA-based nano-stars. *Biotechnol. Rep.* **11**, 53–61 (2016).
127. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**, 163–176 (2017).
128. Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393–1398 (2004).

129. Hacker, D. L., De Jesus, M. & Wurm, F. M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol. Adv.* **27**, 1023–1027 (2009).
130. Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K.-A. & Schweikl, H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent. Mater.* **18**, 318–323 (2002).
131. Yilmaz, Z., Dogan, A. L., Ozdemir, O. & Serper, A. Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dent. Mater. J.* **31**, 1028–1032 (2012).
132. Tua-ngam, P. *et al.* L929 cell cytotoxicity associated with experimental and commercial dental flosses. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **265**, 012010 (2017).
133. Abraham, R. T. & Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 301 (2004).
134. Audiffred, J. F., De Leo, S. E., Brown, P. K., Hale-Donze, H. & Monroe, W. T. Characterization and applications of serum-free induced adhesion in jurkat suspension cells. *Biotechnol. Bioeng.* **106**, 784–793 (2010).
135. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
136. Al-Dosari, M. S. & Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* **11**, 671–681 (2009).
137. Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* **66**, 188–193 (1975).
138. K H Jones & J A Senft. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 77–79 (1985).
139. ISO 10993–5:2009 Biological evaluation of medical devices part 5: tests for in vitro cytotoxicity, 3rd ed.; Stage: 90.92 - TC 194 - ICS: 11.100.20.

140. Scudiero, D. A. *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827–4833 (1988).
141. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. in *Assay Guidance Manual* (eds. Sittampalam, G. S. *et al.*) (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004).
142. Wang, X., Zhou, L., Ma, Y., Li, X. & Gu, H. Control of aggregate size of polyethyleneimine-coated magnetic nanoparticles for magnetofection. *Nano Res.* **2**, 365–372 (2010).
143. Prabha, S., Zhou, W.-Z., Panyam, J. & Labhasetwar, V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **244**, 105–115 (2002).
144. Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q. & Yu, A. B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 1027–1040 (2006).
145. Jones, C. H. *et al.* Synthesis of Cationic Polylactides with Tunable Charge Densities as Nanocarriers for Effective Gene Delivery. *Mol. Pharm.* **10**, 1138–1145 (2013).
146. Joris, F. *et al.* Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro–in vivo gap. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 8339 (2013).
147. Yin Win, K. & Feng, S.-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* **26**, 2713–2722 (2005).
148. Hong, S. *et al.* Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport. *Bioconjug. Chem.* **15**, 774–782 (2004).

149. Mecke, A. *et al.* Lipid Bilayer Disruption by Polycationic Polymers: The Roles of Size and Chemical Functional Group. *Langmuir* **21**, 10348–10354 (2005).
150. Prevette, L. E., Mullen, D. G. & Banaszak Holl, M. M. Polycation-Induced Cell Membrane Permeability Does Not Enhance Cellular Uptake or Expression Efficiency of Delivered DNA. *Mol. Pharm.* **7**, 870–883 (2010).
151. Rawlinson, L.-A. B., O'Brien, P. J. & Brayden, D. J. High content analysis of cytotoxic effects of pDMAEMA on human intestinal epithelial and monocyte cultures. *J. Controlled Release* **146**, 84–92 (2010).
152. Grandinetti, G., Smith, A. E. & Reineke, T. M. Membrane and Nuclear Permeabilization by Polymeric pDNA Vehicles: Efficient Method for Gene Delivery or Mechanism of Cytotoxicity? (2012). doi:10.1021/mp200368p
153. Brunk, U. T., Neuzil, J. & Eaton, J. W. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep.* **6**, 91–97 (2001).
154. Jones, R. A., Poniris, M. H. & Wilson, M. R. pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **96**, 379–391 (2004).
155. Yue, Y. *et al.* Revisit complexation between DNA and polyethylenimine--effect of length of free polycationic chains on gene transfection. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **152**, 143–151 (2011).
156. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **114**, 100–109 (2006).
157. Majewski, A. P. *et al.* PDMAEMA-Grafted Core–Shell–Corona Particles for Nonviral Gene Delivery and Magnetic Cell Separation. *Biomacromolecules* **14**, 3081–3090 (2013).
158. Mislick, K. A. & Baldeschwieler, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12349–12354 (1996).

159. Yameen, B. *et al.* Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J. Controlled Release* **190**, 485–499 (2014).
160. Müller, R. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **138**, 85–94 (1996).
161. Gupta, A. K. & Gupta, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **26**, 1565–1573 (2005).
162. Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Rev.* **112**, 2323–2338 (2012).
163. Mok, H. & Zhang, M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle-Based Delivery Systems for Biotherapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 73–87 (2013).
164. Babic, M. *et al.* Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug. Chem.* **20**, 283–294 (2009).
165. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44 (2003).
166. Layman, J. M., Ramirez, S. M., Green, M. D. & Long, T. E. Influence of Polycation Molecular Weight on Poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-Mediated DNA Delivery In Vitro. *Biomacromolecules* **10**, 1244–1252 (2009).
167. Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T. & van Deurs, B. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 413–420 (2011).
168. Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 268–275 (1999).
169. Schweiger, C. *et al.* Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge. *J. Nanobiotechnology* **10**, 28 (2012).

170. Nouri, A. *et al.* Insight into the role of N, N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) conjugation onto poly(ethylenimine): cell viability and gene transfection studies. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23**, 2967–2980 (2012).
171. Duncan, R., Pratten, M. K. & Lloyd, J. B. Mechanism of polycation stimulation of pinocytosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **587**, 463–475 (1979).
172. Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C. & Kunert, R. Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4645–4657 (2015).
173. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
174. Okon, E. *et al.* Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **71**, 895–903 (1994).
175. Arbab, A. S. *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* **18**, 383–389 (2005).
176. Ohkuma, S. & Poole, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3327–3331 (1978).
177. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
178. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution *In Situ* Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
179. Manunta, M., Tan, P. H., Sagoo, P., Kashefi, K. & George, A. J. T. Gene delivery by dendrimers operates via a cholesterol dependent pathway. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2730–2739 (2004).

180. McCloskey, K. E., Chalmers, J. J. & Zborowski, M. Magnetic Cell Separation: Characterization of Magnetophoretic Mobility. *Anal. Chem.* **75**, 6868–6874 (2003).
181. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231–238 (1990).
182. Pezzoli, D., Giupponi, E., Mantovani, D. & Candiani, G. Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Sci. Rep.* **7**, 44134 (2017).
183. Rawlinson, L.-A. B. *et al.* Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules* **11**, 443–453 (2010).
184. Pan, J. *et al.* Efficient Transfection by Using PDMAEMA-Modified SiNWAs as a Platform for Ca²⁺-Dependent Gene Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 15138–15144 (2016).
185. van de Wetering, P., Cherng, J. Y., Talsma, H., Crommelin, D. J. & Hennink, W. E. 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **53**, 145–153 (1998).
186. Kircheis, R., Wightman, L. & Wagner, E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 341–358 (2001).
187. Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A. & Seymour, L. W. Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* **6**, 643–650 (1999).
188. Dunkelberger, J. R. & Song, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* **20**, 34–50 (2009).
189. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Publ. Online 01 Febr. 2000 Doi101038sjgt3301052* **7**, (2000).

190. Malam, Y. & Seifalian, E. J. L. and A. M. Current Trends in the Application of Nanoparticles in Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry* (2011). Available at: <http://www.eurekaselect.com/73474/article>. (Accessed: 23rd October 2017)
191. Xu, L. & Anchordoquy, T. J. Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *J. Pharm. Sci.* **100**, 38–52 (2011).
192. Voß, Y. *et al.* Thin Poly(Di(Ethylene Glycol)Methyl Ether Methacrylate) Homopolymer Brushes Allow Controlled Adsorption and Desorption of PaTu 8988t Cells. *Macromol. Biosci.* **17**, n/a-n/a (2017).
193. Xu, F. J. *et al.* Star-shaped cationic polymers by atom transfer radical polymerization from beta-cyclodextrin cores for nonviral gene delivery. *Biomacromolecules* **10**, 285–293 (2009).
194. Protein - Proteins of the blood serum | biochemistry. *Encyclopedia Britannica* Available at: <https://www.britannica.com/science/protein/Proteins-of-the-blood-serum>. (Accessed: 7th February 2018)
195. *Polymer Drugs in the Clinical Stage: Advantages and Prospects*. (Springer US, 2003).
196. Kircheis, R. & Wagner, E. Polycation/DNA complexes for in vivo gene delivery. *Gene Ther. Regul.* **1**, 95–114 (2000).
197. Venkataraman, S. *et al.* The role of PEG architecture and molecular weight in the gene transfection performance of PEGylated poly(dimethylaminoethyl methacrylate) based cationic polymers. *Biomaterials* **32**, 2369–2378 (2011).
198. Mishra, S., Webster, P. & Davis, M. E. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 97–111 (2004).

199. Deshpande, M. C. *et al.* The effect of poly(ethylene glycol) molecular architecture on cellular interaction and uptake of DNA complexes. *J. Controlled Release* **97**, 143–156 (2004).
200. Cedervall, T. *et al.* Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 2050–2055 (2007).
201. Maiorano, G. *et al.* Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein–Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. *ACS Nano* **4**, 7481–7491 (2010).
202. Pezzoli, D., Chiesa, R., De Nardo, L. & Candiani, G. We still have a long way to go to effectively deliver genes! *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, e82-91 (2012).
203. Suh, H., Jeong, B., Liu, F. & Kim, S. W. Cellular Uptake Study of Biodegradable Nanoparticles in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharm. Res.* **15**, 1495–1498 (1998).
204. Winey, M., Meehl, J. B., O’Toole, E. T. & Giddings, T. H. Conventional transmission electron microscopy. *Mol. Biol. Cell* **25**, 319–323 (2014).
205. Sawada, H., Shimura, N., Hosokawa, F., Shibata, N. & Ikuhara, Y. Resolving 45-pm-separated Si–Si atomic columns with an aberration-corrected STEM. *Microscopy* **64**, 213–217 (2015).
206. Egerton, R. F. Electron energy-loss spectroscopy in the TEM. *Rep. Prog. Phys.* **72**, 016502 (2009).
207. Trebbia, P. & Bonnet, N. EELS elemental mapping with unconventional methods I. Theoretical basis: Image analysis with multivariate statistics and entropy concepts. *Ultramicroscopy* **34**, 165–178 (1990).
208. EELS elemental mapping with unconventional methods II. Applications to biological specimens. *Ultramicroscopy* **34**, 179–203 (1990).

209. Milne, J. L. S. *et al.* Cryo-electron microscopy - a primer for the non-microscopist. *FEBS J.* **280**, 28–45 (2013).
210. Kuehlbrandt, W. Cryo-EM enters a new era. *eLife* **3**, (2014).
211. Rascol, E. *et al.* Biological Fate of Fe₃O₄ Core-Shell Mesoporous Silica Nanoparticles Depending on Particle Surface Chemistry. *Nanomaterials* **7**, 162 (2017).
212. Rueden, C. T. *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (2017).
213. Rogowski, M., Scholz, D. & Geimer, S. Chapter Fourteen - Electron Microscopy of Flagella, Primary Cilia, and Intraflagellar Transport in Flat-Embedded Cells. in *Methods in Enzymology* (ed. Wallace F. Marshall) **Volume 524**, 243–263 (Academic Press, 2013).
214. Suzuki, H., Toyooka, T. & Ibuki, Y. Simple and Easy Method to Evaluate Uptake Potential of Nanoparticles in Mammalian Cells Using a Flow Cytometric Light Scatter Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 3018–3024 (2007).
215. Strehl, C. *et al.* Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells. *Int. J. Nanomedicine* 3429 (2015). doi:10.2147/IJN.S75936
216. Piper, R. C. & Katzmann, D. J. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 519–547 (2007).
217. Sahay, G. *et al.* Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat. Biotechnol.* **31**, 653–658 (2013).
218. Prijic, S. *et al.* Increased Cellular Uptake of Biocompatible Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Malignant Cells by an External Magnetic Field. *J. Membr. Biol.* **236**, 167–179 (2010).
219. Jiang, X. *et al.* Endo- and Exocytosis of Zwitterionic Quantum Dot Nanoparticles by Live HeLa Cells. *ACS Nano* **4**, 6787–6797 (2010).

220. Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A. & Welsh, M. J. Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 18997–19007 (1995).
221. Calero, M. *et al.* Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells. *J. Nanobiotechnology* **13**, 16 (2015).
222. Jasinski, J., Pinkerton, K. E., Kennedy, I. M. & Leppert, V. J. Surface oxidation state of combustion-synthesized γ -Fe₂O₃ nanoparticles determined by electron energy loss spectroscopy in the transmission electron microscope. *Sens. Actuators B Chem.* **109**, 19–23 (2005).
223. J. Masina, C. *et al.* Structural and magnetic properties of ferrihydrite nanoparticles. *RSC Adv.* **5**, 39643–39650 (2015).
224. Allen, L. J. *et al.* Elemental mapping in scanning transmission electron microscopy. *J. Phys. Conf. Ser.* **241**, 012061 (2010).
225. Ruhland, T. M., Reichstein, P. M., Majewski, A. P., Walther, A. & Müller, A. H. E. Superparamagnetic and fluorescent thermo-responsive core–shell–corona hybrid nanogels with a protective silica shell. *J. Colloid Interface Sci.* **374**, 45–53 (2012).
226. ISO 10993–5:2009 Biological evaluation of medical devices part 5: tests for in vitro cytotoxicity, 3rd ed.; Stage: 90.92 - TC 194 - ICS: 11.100.20.
227. Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* **52**, 591–611 (1965).
228. *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing. (R Core Team, 2016).

8.7 Abkürzungsverzeichnis

ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EELS	Elektronenenergieverlustspektroskopie
FCS	Fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MRI	Magnetic Resonance Imaging
PDEGMA	Poly(di(ethylenglycol))methylethermethacrylat
PDI	Polydispersitätsindex
PDMA	(Poly(N,N-dimethylacrylamid)
PDMAEMA	Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Transfer
MFI	Mean Fluorescence Intensity
PEG	Polyethylenglycol
RHS	Retikuloendotheliales System
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPION	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle
TGA	Thermogravimetrischen Analyse

8.8 Liste der Publikationen, die auf Ergebnissen dieser Arbeit basieren

Majewski, A. P. et al. PDMAEMA-Grafted Core–Shell–Corona Particles for Nonviral Gene Delivery and Magnetic Cell Separation. *Biomacromolecules* 14, 3081–3090 (2013).

Raup, A. et al. Influence of Polyplex Formation on the Performance of Star-Shaped Polycationic Transfection Agents for Mammalian Cells. *Polymers* 8, 224 (2016).

Stahlschmidt, U., Jérôme, V., Majewski, A. P., Müller, A. H. E. & Freitag, R. Systematic Study of a Library of PDMAEMA-Based, Superparamagnetic Nano-Stars for the Transfection of CHO-K1 Cells. *Polymers* 9, 156 (2017).

8.9 Lebenslauf

Zur Person

Ullrich Stahlschmidt

Geboren am 20.02.1986 in Ravensburg

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Beruflicher und akademischer Werdegang

1998 - 2005 Gymnasium Bad Waldsee

Abschluss: Abitur

10/2006 – 09/2009 Studium: Biologie an der Universität Bayreuth,
Abschluss: Bachelor of Science

Thema der Bachelorarbeit: Untersuchung zum Einfluss von endophytischen Pilzen auf die Bildung von Pflanzengallen an *Salix fragilis*

10/2009 – 05/2013 Studium: Molekulare Biologie und Biochemie an der Universität Bayreuth, Abschluss: Master of Science

Thema der Masterarbeit: Untersuchung von neuartigen Nanopartikeln auf ihre Verwendung als Genvehikel in Tierzellen

07/2013 – 12/2016 Promotion am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Universität Bayreuth.

Thema: Systematische Studie der Transfektion von Säugerzellen mittels PDMAEMA- basierter paramagnetischer Nanosterne

8.10 Danksagung

Zu allererst möchte ich Prof Dr. Freitag danken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Universität Bayreuth durchzuführen. Ich bedanke mich für das Vertrauen und die Freiheit, die mir bei der Bearbeitung des Forschungsthemas entgegengebracht wurde. Durch die Teilnahme an verschiedenen Konferenzen, die Zusammenarbeit bei den Publikationen und den konstruktiven Projektmeetings konnte ich viel dazu lernen. Ebenso dankbar war ich, dass ich am Bierbrauprojekt mitwirken konnte, welches jährlich im Brauwettbewerb in Hamburg gipfelte und für mich eine schöne Abwechslung zum Laboralltag in der Zellkultur darstellte. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Valérie Jérôme für die gute Betreuung und interessanten fachlichen Diskussionen bedanken. Mein Dank gilt des Weiteren für die restlichen Mitarbeiter des Lehrstuhls Dr. Frank Hilbrig, Edith Huebner, Helena Schneider, Andrea Schott und Kristina Thompson, welche zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Dies gilt ganz besonders für die anderen Doktoranden Alexander Raup, Nicolas Weithman und Patrick Kaiser die dafür gesorgt haben, dass ich wirklich eine tolle und unvergessliche Zeit in Bayreuth hatte.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Markus Drechsler für die Hilfe bei der Anfertigung der Elektronenmikroskopieaufnahmen, sowie an Prof. Dr. Geimer und Rita Grotjahn für die Einarbeitung in die Probenpräparierung für die Elektronenmikroskopie. Ebenso möchte ich mich noch beim Team vom MC2-Lehrstuhl für die schöne Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Dr. Alexander Majewski und Prof Dr. Axel Müller.

Schließlich bedanke ich mich noch bei Isabelle Wagner, Marie Friedle und meinen beiden Brüdern Niko Stahlschmidt und Max Stahlschmidt fürs Korrekturlesen und ganz besonders bei allen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung während dieser Zeit.

8.11 Erklärung

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift